

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年4月25日 (25.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/33122 A1(51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/68, C12N 15/09, G01N 33/53, 33/50, C12Q 1/02, A61K 48/00, 39/395, A01K 67/027 // C07K 16/18, C12N 5/10

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08937

(22) 国際出願日: 2001年10月11日 (11.10.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-314093
2000年10月13日 (13.10.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ジェノックス創薬研究所 (GENOX RESEARCH, INC.) [JP/JP]; 〒300-2635 茨城県つくば市東光台5-1-3 Ibaraki (JP). 国立小児病院院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by GENERAL DIRECTOR OF NATIONAL CHILDREN'S HOSPITAL) [JP/JP]; 〒154-8509 東京都世田谷区太子堂3-35-31 Tokyo (JP). エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4-6-10 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 杉田雄二

(SUGITA, Yuji) [JP/JP]. 橋田亮一 (HASHIDA, Ryōichi) [JP/JP]. 小川 薫 (OGAWA, Kaoru) [JP/JP]; 〒216-0001 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社 ジェノックス創薬研究所内 Kanagawa (JP). 大林正也 (OBAYASHI, Masaya) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町3-6-6 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 長洲毅志 (NAGASU, Takeshi) [JP/JP]. 高橋英機 (TAKAHASHI, Eiki) [JP/JP]; 〒300-2635 茨城県つくば市東光台5-1-3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 斎藤博久 (SAITO, Hirohisa) [JP/JP]; 〒154-8509 東京都世田谷区太子堂3-35-31 国立小児病院小児医療センター 免疫アレルギー研究部内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(国内): CA, JP, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF EXAMINING ALLERGIC DISEASES

(54) 発明の名称: アレルギー性疾患の検査方法

(57) Abstract: A gene showing a difference in expression in eosinophils of patients with atopic dermatitis is searched for by the differential display method. As a result, intersectin 2 is identified as a gene showing significantly elevated expression in eosinophils of patients with mild atopic dermatitis. It is found out that this gene is usable in examining allergic diseases and screening candidate compounds for remedies.

(57) 要約:

ディファレンシャルディスプレイ法により、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現に差の見られる遺伝子を探索した。その結果、軽症の患者の好酸球において、有意に発現が上昇している遺伝子としてインターベクチン2が同定された。本発明者らは、この遺伝子をアレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングに使用できることを見出した。

WO 02/33122 A1

- 1 -

明細書

アレルギー性疾患の検査方法

技術分野

本発明は、アレルギー性疾患の検査方法に関する。

背景技術

アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患は、多因子性の病気(multifactorial diseases)と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。

またアレルギー性疾患には、変異や欠陥を有する遺伝子の発現や、特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺伝子発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

近年の遺伝子発現の解析技術の発達により、多くの臨床試料で、遺伝子の発現を解析・比較することが可能となった。このような方法としては、ディファレンシャルディスプレイ(DD)法が有用である。ディファレンシャルディスプレイ法は、ライアンおよびパディー(Liang and Pardee)によって 1992 年に最初に開発された(Science, 1992, 257:967-971)。この方法を用いることによって、1 回に数十種類以上のサンプルをスクリーニングすることができ、それらのサンプル中で発現が変化した遺伝子を検出することができる。このような方法を用いて、変異が生じた遺伝子や、時間や環境とともに発現が変わるような遺伝子を調べることによって、病因遺伝子の解明のために重要な情報がもたらされることが期待

- 2 -

される。これらの遺伝子には、環境要因によって発現に影響を受けるような遺伝子も含まれる。

さて、現在アレルギー疾患の診断においては、一般に、問診、家族歴、そして本人の既往症の確認が重要な要素となっている。またアレルギーをより客観的な情報に基づいて診断するために、血液を試料とする試験方法や、アレルゲンに対する患者の免疫学的な応答を観察する方法も実施されている。前者の例として、アレルゲン特異的 IgE 測定、白血球ヒスタミン遊離試験、あるいはリンパ球幼若化試験等が挙げられる。アレルゲン特異的 IgE の存在は、そのアレルゲンに対するアレルギー反応の証明である。しかし患者によっては、必ずしもアレルゲン特異的な IgE を検出できるとは限らない場合もある。また、その測定原理上、診断に必要なアレルゲンの全てに対して、試験を実施しなければならない。白血球ヒスタミン遊離試験やリンパ球幼若化試験は、免疫システムのアレルゲンに対する反応を *in vitro* で観察する方法である。これらの方法は、操作が煩雑である。

一方、患者を実際にアレルゲンに接触させたときに観察される免疫応答をアレルギーの診断に役立てる方法（後者）も公知である。ブリック・テスト、スクラッチ・テスト、パッチ・テスト、皮内反応、あるいは誘発試験等が、この種の試験に含まれる。これらの試験では、患者のアレルギー反応を直接診断することができる反面、実際に被検者をアレルゲンに曝露する侵襲性の高い検査であると言いうことができる。

この他、アレルゲンに関わらず、アレルギー反応の関与を証明するための試験方法も試みられている。たとえば、血清 IgE 値が高値である場合、その患者にはアレルギー反応が起きていると推定することができる。血清 IgE 値は、アレルゲン特異 IgE の総量に相当する情報である。アレルゲンの種類に関わらず IgE の総量を決定することは容易であるが、非アトピー型気管支炎等の疾患を持つ患者では、IgE が低値となる場合がある。

好酸球数と ECP 値は、I 型アレルギーに引き続いで起きる遲延型反応や、ア

- 3 -

レルギー性炎症反応に関連する診断項目である。好酸球の数は、アレルギー症状の進展を反映するとされている。また、好酸球の顆粒に含まれる蛋白質であるECP(eosinophil cationic protein)も、喘息患者の発作に伴って強く活性化される。これらの診断項目は、確かにアレルギー症状を反映するものではある。しかし現実には、好酸球の增多はアレルギー症状の進行にともなって顕著に表れてくるのが一般的な所見である。したがって好酸球の明らかな增多が見られる時期には、顕著なアレルギー症状を伴っているケースが多い。そのため、初期のアレルギー性疾患の指標として好酸球数を用いることはできない。

したがって、患者に対する危険が少なく、しかも早期の診断に必要な情報を容易に得ることができる、アレルギー性疾患のマーカーが提供されれば有用である。このようなマーカーは、アレルギー性疾患の発症に深く関与していると考えられるので、診断のみならず、アレルギー症状のコントロールにおいても、重要な標的となる可能性がある。

発明の開示

本発明は、特に初期アレルギー性疾患の指標とすることができます新たな遺伝子の提供を課題とする。さらに、本発明は該指標に基づく、初期アレルギー性疾患の検査方法およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

初期アレルギー性疾患に関与する遺伝子は、アレルギー症状の、より上流にあって、他の遺伝子の発現を誘導していく役割を果たしていると考えられる。本発明者らは、このような遺伝子を特定することができれば、その発現状態を調べることによって初期アレルギー性疾患の診断が可能となると考えた。

また本発明者らは、このような遺伝子が、アレルギー性疾患の治療においても、重要な標的となりうると考えた。初期アレルギー性疾患に有効な薬剤は、アレルギーの初期の段階のみならず、重病化した後においても、病態の本質的な原因に

- 4 -

対して有効な治療薬となる可能性がある。このような治療薬には、単なる対症療法ではなく、アレルギーの根治につながる薬理作用を期待できる。

まず本発明者らは、健常者とアトピー性皮膚炎の患者から得られた末梢血好酸球において発現に差の見られる遺伝子を単離した。発現レベルの違いに基づいて遺伝子を取得する方法としては、本発明者らが開発した DD システム (WO 00/65046)を応用した。この方法は、既に確立された「蛍光 DD(Fluorescent DD)法」(T.Ito ら, 1994, FEBS Lett. 351: 231-236) の手順に基づき、複数のヒトの血液から調製した白血球細胞 RNA サンプルを解析できる DD システムである。一方、遺伝子の発現状態を比較する対象としては、好酸球を選択した。好酸球は、アレルギー症状の重要な指標とされている。したがって、好酸球細胞において、発現レベルに差を生じる遺伝子は、アレルギー症状と密接に関連していると考えられる。

続いて本発明者らは、DD システムによって取得した遺伝子について、進行度の異なるアレルギー性疾患患者と健常者でその発現レベルを比較した。進行度の異なる患者と健常者との比較によって、初期アレルギー性疾患患者と健常者とで好酸球における発現レベルに差がある遺伝子を選択すれば、初期アレルギー性疾患に関連する遺伝子を見出すことができると思った。

このような戦略に基づいて末梢血好酸球における遺伝子の発現状態を解析した結果、本発明者らは、配列番号：1 に記載された塩基配列を含む遺伝子が初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において、有意に発現が増加していることを確認した。

なおこの塩基配列についてデータベース検索を行ったところ、配列番号：1 に記載の 1835-17 断片の塩基配列が、intersectin2 をコードすると予測される塩基配列 (GenBank AF248540) にほぼ一致した。この遺伝子とアレルギー性疾患との関連性は示唆されていない。したがって、本発明の知見は新規である。さらに本発明者らは、この遺伝子の発現量を指標として、アレルギー性疾患の検査、

およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、初期アレルギー性疾患において高い発現を示す遺伝子のアレルギー性疾患の指標遺伝子としての応用に関する。より具体的には、該遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、および候補化合物の該遺伝子の発現に与える影響を検出する方法、更にこの検出方法に基づくアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法に関する。

〔1〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法であって、指標遺伝子がインターチェクチン2またはインターチェクチン2と機能的に同等な遺伝子である方法。

a) 被検者の生体試料における、指標遺伝子の発現レベルを測定する工程

b) 健常者の生体試料における指標遺伝子の発現レベルと比較する工程

〔2〕アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔1〕に記載の検査方法。

〔3〕遺伝子の発現レベルを、cDNAのPCRによって測定する〔1〕に記載の検査方法。

〔4〕遺伝子の発現レベルを、前記遺伝子によってコードされる蛋白質の検出によって測定する〔1〕に記載の検査方法。

〔5〕生体試料が末梢血好酸球細胞を含む試料である〔1〕に記載の方法。

〔6〕インターチェクチン2またはインターチェクチン2と機能的に同等な遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬。

〔7〕インターチェクチン2またはインターチェクチン2と機能的に同等な遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体からなる、アレルギー性疾患検査用試薬。

〔8〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であつ

て、指標遺伝子がインターベクチン2またはインターベクチン2と機能的に同等な遺伝子である方法。

- (1) 指標遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程
- (2) 指標遺伝子の発現レベルを測定する工程、および
- (3) 対照と比較して指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

〔9〕細胞が好酸球細胞である〔8〕に記載の方法。

〔10〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子がインターベクチン2またはインターベクチン2と機能的に同等な遺伝子である方法。

- (1) 被験動物に候補化合物を投与する工程、
- (2) 被験動物の生体試料における指標遺伝子の発現強度を測定する工程、および
- (3) 対照と比較して指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

〔11〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子がインターベクチン2またはインターベクチン2と機能的に同等な遺伝子である方法。

- (1) 指標遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、
- (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および
- (3) 対照と比較して前記レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

〔12〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子がインターベクチン2またはインターベクチン2と機能

的に同等な遺伝子である方法。

(1) 指標遺伝子によってコードされる蛋白質と候補物質を接触させる工程、

(2) 前記蛋白質の活性を測定する工程、および

(3) 対照と比較して前記蛋白質の活性を低下させる化合物を選択する工程

〔13〕〔8〕、〔10〕、〔11〕、および〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患の治療薬。

〔14〕指標遺伝子、またはその一部のアンチセンス DNA を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬であって、指標遺伝子がインターチェクチン 2 またはインターチェクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である治療薬。

〔15〕指標遺伝子によってコードされる蛋白質に結合する抗体を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬であって、指標遺伝子がインターチェクチン 2 またはインターチェクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である治療薬。

〔16〕指標遺伝子の好酸球細胞における発現強度を上昇させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物のアレルギー性疾患のモデル動物としての使用であって、指標遺伝子がインターチェクチン 2 またはインターチェクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である使用。

〔17〕指標遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドと、指標遺伝子を発現する細胞からなる、アレルギー性疾患の治療薬をスクリーニングするためのキットであって、指標遺伝子がインターチェクチン 2 またはインターチェクチン 2 と機能的に同等な遺伝子であるキット。

〔18〕指標遺伝子によってコードされるアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体と、指標遺伝子を発現する細胞からなる、アレルギー性疾患の治

療薬をスクリーニングするためのキットであって、指標遺伝子がインターベクチン2またはインターベクチン2と機能的に同等な遺伝子であるキット。

本発明において指標遺伝子とするインターベクチン2遺伝子の構造は既に明らかにされている。すなわち、本発明者らが DD 法に基づいて単離した断片 1835-17 の塩基配列（配列番号：1）は、インターベクチン2 (intersectin2) をコードすると予測される塩基配列 (KIAA1256 ; GenBank AB033082) にほぼ一致した。したがってインターベクチン2遺伝子は、本発明における指標遺伝子として用いることができる。更に Seifert,M. は、インターベクチン2遺伝子によってコードされる全長アミノ酸配列 (GenBank AF248540) を明らかにした。本発明におけるインターベクチン2遺伝子 (GenBank AF248540) の塩基配列を配列番号：15 に、この塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号：16 に示した。

インターベクチン2遺伝子 (KIAA1256 遺伝子) は、ヒト脳に由来するライブラリーから新規な遺伝子として単離され、Ohara,O et.,al. によって DNA データベースに登録された (GenBank AB033082)。先に登録されているマウスのインターベクチン2 (intersectin2; EMBO J. 18 (5), 1159-1171 (1999)) の塩基配列、およびアミノ酸配列 (GenBank Accession No AF132480) のホモジーから、ヒトのインターベクチン2と推測されている。なお GenBank Accession No AF132480 は、マウス ESE2 と言う名称で登録されている。ヒトのインターベクチン2遺伝子とマウスのインターベクチン2は、高いホモジーを有している（塩基配列 89%、アミノ酸配列 94%）。実施例において確認したように、マウスのインターベクチン2は、アレルギー性皮膚炎モデルにおいて発現の上昇が確認された。したがって、配列番号：15 に示す塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を有するポリヌクレオチドは、本発明における指標遺伝子として用いることができる。あるいは配列番号：16 に示すアミノ酸配列に対して、

95%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、本発明における指標遺伝子として用いることができる。

本発明は、インターベクチン2またはインターベクチン2と機能的に同等な遺伝子のアレルギー性疾患の指標としての使用に関する。本発明において、インターベクチン2またはインターベクチン2と機能的に同等な遺伝子を、指標遺伝子と言う。また指標遺伝子によってコードされる蛋白質を、指標蛋白質と言う。インターベクチン2遺伝子の構造は、GenBank Acc. No. AF248540として公知である。

本発明において、ある蛋白質が初期のアレルギー性疾患者、あるいは初期のアレルギー疾患動物の好酸球において発現が増加するとき、配列番号：16に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と機能的に同等と言う。ある蛋白質が、好酸球において発現が増加することは、採取された好酸球における当該蛋白質をコードする遺伝子の発現レベルを比較することによって確認することができる。

本発明において、機能的に同等な遺伝子には、配列番号：15に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。このようなポリヌクレオチドは、配列番号：15に記載の塩基配列に基づいて、ハイブリダイズやPCRなどの公知の手法によって取得することができる。たとえば、配列番号：15に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、ストリンジエントな条件下で、白血球細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、配列番号：15に記載の塩基配列と同一性の高い塩基配列からなるcDNAを取得することができる。あるポリヌクレオチドがストリンジエントな条件下で配列番号：15に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドとハイブリダイズするとき、このポリヌクレオチドがコードする蛋白質は指標蛋白質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。

ストリンジエントな条件とは、一般的には以下のようないくつかの条件を示すことができる。

る。すなわち、4×SSC、65°Cでハイブリダイゼーションさせ、0.1×SSCを用いて65°Cで1時間洗浄する。ストリンジエンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度(Tm)に応じて調整することができる。Tmはハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成（塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度）によって変動する。したがって、当業者であればこれらの条件を考慮して同等のストリンジエンシーを与える条件を経験的に設定することができる。

同一性の高い塩基配列からなるcDNAによってコードされる蛋白質は、本発明における機能的に同等な蛋白質である可能性が高い。本発明において、同一性が高い塩基配列とは、一般的に70%以上、通常は80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を示す塩基配列を言う。塩基配列の同一性は、BLASTN等の公知のアルゴリズムによって計算することができる。

あるいはインターセクチン2蛋白質のアミノ酸配列（配列番号：16）に対して、たとえば90%以上、望ましくは95%以上、更に望ましくは99%以上の相同意を有する蛋白質をコードする遺伝子は、インターセクチン2遺伝子と機能的に同等な遺伝子として示すことができる。

あるいは、配列番号：15に記載の塩基配列から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、やはり白血球細胞のcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行うことにより、同一性の高いcDNAを取得することもできる。cDNAのソースとしてヒトの細胞を用いれば、ヒトのcDNAを取得することができる。またヒト以外の、脊椎動物細胞を利用すれば、異種動物におけるカウンターパートを取得することができる。このような非ヒト動物としては、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヤギなどの多くの実験動物を例示することができる。たとえばマウスのインターセクチン2は公知である。実験動物における本発明の指標遺伝子は、各動物種におけるアレルギーモデル動物の作成や、ア

レルギーの治療薬の開発におけるマーカーとして有用である。

また、配列番号：15に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして増幅することができる遺伝子であって、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において有意に発現が増加する蛋白質をコードする遺伝子も、機能的に同等な遺伝子である。

本発明において、アレルギー性疾患(allergic disease)とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲンへの曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によって白血球細胞が免疫応答を示すことを意味する。アレルゲンとしては、ダニ抗原や花粉抗原等を例示することができる。

代表的なアレルギー性疾患には、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、花粉症、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因(allergic diathesis)とは、アレルギー性疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族性に発症するアレルギー性疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因となる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。

本発明における指標遺伝子は、健常者との比較において、軽症のアトピー性皮膚炎患者の好酸球で発現量の増加を示した。従って、本発明の指標遺伝子の発現レベルを指標として、アレルギー性疾患の検査を行うことができる。本発明の検査方法においては、本発明の指標遺伝子のみならず他のアレルギー疾患の指標を組み合わせることもできる。複数の指標に基づいて検査を行うことにより、より正確な判断を行うことができる。アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患患者は、ヘテロジニアス（不均一）な集団なので、複数の遺伝子を指標とすることにより、より確実な診断を行うことができる。

本発明におけるアレルギー疾患の検査とは、たとえば以下のようないくつかの検査が含まれる。すなわち、アレルギー性疾患が疑われる初期症状を示す患者における本発

明の指標遺伝子の発現の上昇は、その患者の初期症状の原因がアレルギー性疾患であることを裏付けている。

本発明において、指標遺伝子の発現レベルとは、この遺伝子の mRNA への転写、並びに蛋白質への翻訳を含む。したがって本発明によるアレルギー疾患の検査方法は、前記遺伝子に対応する mRNA の発現強度、あるいは前記遺伝子によってコードされる蛋白質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

本発明におけるアレルギー性疾患の検査における指標遺伝子の発現レベルの測定は、公知の遺伝子解析方法にしたがって実施することができる。具体的には、たとえばこの遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または指標遺伝子にハイブリダイズする DNA をプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することができる。

本発明の検査に用いられるプローブまたはプライマーとしては、配列番号： 15 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを利用することができる。ここで「相補鎖」とは、A:T (RNA の場合は U) 、 G:C の塩基対からなる 2 本鎖 DNA の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95% 以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、 BLAST 等のアルゴリズムにより決定することができる。

このようなポリヌクレオチドは、指標蛋白質をコードするポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、 15bp ~ 100bp 、好ましくは 15bp ~ 35bp の鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも 15bp の鎖長の DNA が用いられる。

- 13 -

プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

なお、本発明における「ポリヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができる。これらポリヌクレオチドは、合成されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブDNAは、通常、標識したもののが用いられる。標識方法としては、例えば次のような方法を示すことができる。なお用語「オリゴヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドのうち、重合度が比較的低いものを意味している。オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに含まれる。

- ・DNAポリメラーゼIを用いるニックトランスレーションによる標識
- ・ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識
- ・クレノーフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) Genes Probes: A Practical Approach. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- ・RNAポリメラーゼを用いる転写による標識 (Melton DA, Krieg PA, Rebagkiati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) Nucleic Acid Res., 12, 7035-7056)
- ・放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) Nonisotopic DNA Probing Techniques. Academic Press)

ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー性疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットプロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用して行うことができる。さらには、RT-PCR法等の遺

伝子増幅技術を利用することができる。RT-PCR 法においては、遺伝子の増幅過程において PCR 増幅モニター法を用いることにより、指標遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。

PCR 遺伝子増幅モニター法においては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象（DNA もしくは RNA の逆転写産物）にハイブリダイズさせる。PCR 反応が進んで Taq ポリメラーゼの 5'-3' エクソヌクレアーゼ（exonuclease）活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、PCR 増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する（Holland, P.M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280; Livak, K. J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6):357-362; Heid, C. A. et al., Genome Research 6:986-994; Gibson, E. M. U. et al., 1996, Genome Research 6:995-1001）。PCR 増幅モニター法においては、例えば、ABI PRISM7700（PE バイオシステムズ社）を用いることができる。

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、指標遺伝子によりコードされる蛋白質（指標蛋白質）を検出することにより行うことができる。このような検査方法としては、例えば、この遺伝子でコードされる蛋白質に結合する抗体を利用したウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA 法などを利用することができる。

この検出に用いる指標蛋白質に結合する抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体（Milstein C, et al., 1983, Nature 305(5934): 537-40）であることができる。例えば、指標蛋白質に対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。

- 15 -

ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髓腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。

指標蛋白質の検出には、これらの抗体を適宜標識して用いればよい。また、この抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検出することもできる。具体的な検出方法としては、例えば、ELISA法を挙げることができる。

抗原に用いる蛋白質もしくはその部分ペプチドは、例えばこの遺伝子もしくはその一部を発現ベクターに組込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換え蛋白質を発現させ、発現させた組み換え蛋白質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、この遺伝子によってコードされるアミノ酸配列（配列番号：16）、またはその部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。

更に本発明においては、指標遺伝子の発現レベルのみならず、生体試料における指標蛋白質の活性を指標として、アレルギー性疾患の検査を行うこともできる。指標蛋白質の活性とは、各蛋白質が備える生物学的な活性を言う。前記指標蛋白質の活性の検出は、公知の方法に基づいて行うことができる。

たとえばマウスのインターセクチン2(ESE2)は、白血球やその他の細胞におけるリセプターを介した異物の細胞内への取り込みに関与する蛋白であることが分かってきた。この作用は、一般に Clathrin-mediated endocytosis といわれる。たとえば貪食(phagocytosis)や飲作用(pinocytosis)によって、細胞が異物を取り込むときに、ESE2は少なくとも14個以上の他の蛋白と会合してコンプレック

スを作る。ESE2 の EH と SH3 というドメインには、epsin や dynamin 等が結合し、細胞膜を陥入させて空胞を形成するための情報を仲介すると考えられる。epsin や dynamin 等は、貪食時に必須な蛋白であるとされている。ESE を過剰発現すると、貪食能がかえって抑えられるが、これはコンプレックスがうまく形成できなくなるためである。

本発明においては、被検者的好酸球細胞を試料とする。好酸球細胞は、末梢血から公知の方法によって調製することができる。すなわち、たとえばヘパリン採血した血液を遠心分離によって分画し、白血球細胞を分離する。次に白血球細胞から、フィコールによる遠心分離等によって顆粒球細胞を分取し、更に CD16 抗体を用いた好中球のディプリーション等によって好酸球細胞を分離することができる。分離された好酸球を破壊してライセートとすれば、前記蛋白質の免疫学的な測定のための試料とすることができます。あるいはこのライセートから mRNA を抽出すれば、前記遺伝子に対応する mRNA の測定のための試料とすることができます。好酸球のライセートや mRNA の抽出には、市販のキットを利用すると便利である。

あるいは、好酸球の分離を行わず、全血や、末梢血白血球集団を対象として、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルを測定しても良い。この場合には、測定値の補正を行うことによって、細胞における遺伝子の発現レベルの変化を求めることができる。たとえば好酸球に特異的に発現し、かつ細胞の状態に関わらず発現レベルが大きく変動しない遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）の発現レベルの測定値に基づいて、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルの測定値を補正することができる。

また検出すべき蛋白質が分泌型の蛋白質である場合には、被検者の血液や血清などの体液試料に含まれる目的とする蛋白質の量を測定することによって、それをコードする遺伝子の発現レベルの比較が可能である。

本発明によるアレルギー性疾患の検査方法においては、軽症のアレルギー性疾

患で発現の上昇するこの遺伝子がアレルギー性疾患の初期症状の指標となる。

本発明による各種の検査方法に必要な、指標遺伝子の発現レベルを測定するためのポリヌクレオチドや抗体は、アレルギー性疾患の検査用試薬として有用である。指標遺伝子の発現レベルを測定するための試薬としては、たとえば指標遺伝子の塩基配列（配列番号：15）を含むポリヌクレオチド、若しくはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドが用いられる。あるいは、指標蛋白質のアミノ酸配列（配列番号：16）を含むペプチドを認識する抗体を試薬として用いることができる。

上記オリゴヌクレオチドとして、配列番号：15に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであって、少なくとも15塩基の長さを持つオリゴヌクレオチドを用いることができる。ここで「相補鎖」とは、A:T（RNAにおいてはTをUに読みかえる）、G:Cの塩基対からなる2本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、BLAST等の公知のアルゴリズムにより決定することができる。

これらの検査用試薬は、標識の検出に用いられる基質化合物、試料を希釈するための緩衝液、あるいは陽性や陰性の標準試料等を組み合せてアレルギー性疾患の検査用キットとすることができる。更には本発明の検査用キットに、当該キットの使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。

本発明によって、前記指標遺伝子の好酸球細胞における発現レベルが、初期のアトピー性皮膚炎患者の好酸球において上昇することが明らかとなつた。したがって、好酸球細胞においてこの遺伝子、またはこの遺伝子と機能的に同等な遺伝子の発現レベルを人為的に増強した動物は、初期アレルギー性疾患のモデル動物

として利用することができる。なお好酸球における発現レベルの上昇とは、白血球集団全体における標的遺伝子の発現レベルの上昇を含む。すなわち、前記遺伝子の発現レベルを上昇させるのは好酸球のみである場合のみならず、白血球集団全体において前記遺伝子の発現レベルが上昇している場合を含む。本発明において機能的に同等な遺伝子とは、各指標遺伝子によってコードされる蛋白質において明らかにされている活性と同様の活性を備えた蛋白質をコードする遺伝子である。機能的に同等な遺伝子の代表的なものとしては、トランスジェニック動物が本来備えている、その動物種における指標遺伝子のカウンターパートを挙げることができる。

初期アレルギー性疾患において発現が増加する遺伝子は、アレルギー性疾患の病態を上流で制御している遺伝子と言うことができる。言いかえれば、初期アレルギー性疾患において発動を開始する遺伝子の影響下に、下流に位置する様々な遺伝子の発現や抑制が起きることにより、アレルギーの病態が形成されると考えられる。つまり、初期アレルギー性疾患において発現が増加する遺伝子は、アレルギーの病態形成において重要な役割を果たす遺伝子と言える。したがって、この遺伝子の発現を抑制したり、あるいは活性を阻害する薬剤は、アレルギーの治療において、単にアレルギー症状を改善するのみならず、アレルギーの病態形成の本質的な原因を取り除く作用が期待できる。

以上のように、初期アレルギー性疾患において発現が増加する遺伝子には重要な意味がある。そのため、この遺伝子の発現レベルを上昇させることによって得ることができるトランスジェニック動物を初期アレルギー性疾患モデル動物として使用し、遺伝子の役割や、遺伝子を標的とする薬剤を評価することには大きな意義がある。

また本発明による初期アレルギー性疾患動物は、後に述べる初期アレルギー性疾患の治療または予防のための医薬品のスクリーニングに加えて、初期アレルギー性疾患のメカニズムの解明、さらにはスクリーニングされた化合物の安全性

の試験に有用である。

たとえば本発明による初期アレルギー疾患モデル動物が皮膚炎を発症したり、何らかのアレルギー性疾患に関連した測定値の変化を示せば、それを回復させる作用を持った化合物を探索するスクリーニングシステムが構築できる。

本発明において、発現レベルの上昇とは、目的とする遺伝子が外来遺伝子として導入され強制発現している状態、あるいは宿主が備える遺伝子の転写と蛋白質への翻訳が増強されている状態、並びに翻訳産物である蛋白質の分解が抑制された状態のいずれかを意味する。遺伝子の発現レベルは、たとえば実施例に示すような定量的な PCR により確認することができる。また翻訳産物である蛋白質の活性は、正常なインターチェンジ 2 の活性と比較することにより確認することができる。

代表的なトランスジェニック動物は、目的とする遺伝子を導入し強制発現させた動物である。この他のトランスジェニック動物には、たとえば遺伝子のコード領域に変異を導入し、その活性を増強したり、あるいは分解されにくいアミノ酸配列に改変した動物などを示すことができる。アミノ酸配列の変異には、置換、欠失、挿入、あるいは付加を示すことができる。その他、遺伝子の転写調節領域を変異させることにより、指標遺伝子の発現そのものを調節することもできる。

特定の遺伝子を対象として、トランスジェニック動物を得る方法は公知である。すなわち、遺伝子と卵を混合してリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第 4873191 号）、胚性幹細胞（ES 細胞）を使用する方法などによってトランスジェニック動物を得ることができる。その他、レトロウイルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等も開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精することにより、外来遺伝子を導入す

る遺伝子組換え法である (M. Lavitranoet ら Cell, 57, 717, 1989)。

本発明の初期アレルギー性疾患モデル動物として用いるトランスジェニック動物は、ヒト以外のあらゆる脊椎動物を利用して作成することができる。具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、あるいはウシ等の脊椎動物において様々な遺伝子の導入や発現レベルを改変されたトランスジェニック動物が作り出されている。

更に本発明は、アレルギー性疾患治療薬のスクリーニング方法に関する。本発明において、指標遺伝子は、軽症のアトピー性皮膚炎患者の好酸球において有意に発現レベルが上昇している。したがって、この遺伝子の発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、その発現レベルを低下させることができる化合物を選択することによって、アレルギー疾患の治療薬を得ることができる。本発明において遺伝子の発現レベルを低下させる化合物とは、遺伝子の転写、翻訳、蛋白質の活性発現のいずれかのステップを阻害する作用を持つ化合物である。

本発明のアレルギー性疾患治療薬のスクリーニング方法は、*in vivo* で行なうことも *in vitro* で行なうこともできる。このスクリーニングは、たとえば以下のような工程にしたがって実施することができる。

- (1) 被験動物に候補化合物を投与する工程、
- (2) 被験動物の好酸球細胞における前記指標遺伝子の発現レベルを測定する工程、
- (3) 対照と比較して、指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

より具体的には、被験動物から、生体試料を採取し、前記指標遺伝子の発現レベルを対照と比較することにより、本発明によるスクリーニングを実施することができる。生体試料としては、全血、PBMC、あるいは好酸球細胞等を利用することができます。これらの生体試料の採取方法、および調製方法は公知である。

たとえば人間のアトピー性皮膚炎に近いモデルとして、NC/Nga マウスを用い

た皮膚炎自然発症モデルが報告されている。このマウスの耳介にダニ抗原（5 μ g/耳）を2-3日間隔で計8回投与すると、2週間以降にはヒトのアトピー性皮膚炎に酷似した症状を誘発することができる。この系に候補化合物を投与し、指標遺伝子の発現レベルの変化を追跡することによって本発明によるスクリーニングを実施することができる。

このようにして指標遺伝子を発現するモデル動物に薬剤候補化合物を投与し、モデル動物の好酸球における指標遺伝子の発現に対する化合物の作用をモニタすることにより、指標遺伝子の発現レベルに与える薬剤候補化合物の影響を検出することができる。更にこの検出の結果に基づいて、対照と比較して指標遺伝子の発現レベルを低下させる薬剤候補化合物を選択すれば、薬剤候補化合物をスクリーニングすることができる。

このようなスクリーニングにより、指標遺伝子の発現に様々な形で関与する薬剤を選択することができる。具体的には、たとえば次のような作用点を持つ薬剤候補化合物を見出すことができる。

指標遺伝子の発現をもたらすシグナル伝達経路の抑制、

指標遺伝子の転写活性の抑制、

指標遺伝子の転写産物の分解の促進等、

また、in vitro でのスクリーニングにおいては、例えば、指標遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させ、指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する方法が挙げられる。このスクリーニングは、たとえば以下のような工程にしたがって実施することができる。

(1) 指標遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(2) 指標遺伝子の発現レベルを測定する工程、および

(3) 対照と比較して、指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

本発明において、工程(1)に用いるための細胞は、指標遺伝子を適当な発現

- 22 -

ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより得ることができる。利用できるベクター、および宿主細胞は、指標遺伝子を発現し得るものであればよい。宿主一ベクター系における宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等が例示でき、それぞれ利用できるベクターを適宜選択することができる。

ベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などを示すことができる。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法（HVJ（センダイウイルス）、ポリエチレングリコール（PEG）、電気的細胞融合法、微少核融合法（染色体移入））が挙げられる。また、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ジーンパーティクルガン（gene gun）を用いる方法が挙げられる。化学的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リポソーム法、DEAE デキストラン法、プロトプラスト法、赤血球ゴースト法、赤血球膜ゴースト法、マイクロカプセル法が挙げられる。

前記スクリーニング方法においては、指標遺伝子を発現する細胞として、株化白血球細胞を用いることもできる。株化白血球細胞としては、Eol、YY-1、HL-60、TF-1、および AML14.3D10 など白血球由来の株化細胞を例示できる。白血球細胞株の中でも、好酸球に由来する細胞株は、本発明のスクリーニング方法に好適である。好酸球に由来する細胞株は以下に示すとおりである。

Eol

YY-1

AML14.3D10

Eol(Eol-1: Saito H et al, Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. Blood 66, 1233-1240, 1985)は、林原研究所より入手することができる。同様に YY-1(Ogata N et al, The activation of the JAK2/STAT5 pathway is commonly involved in signaling through the

human IL-5 receptor. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, Suppl 1, 24-27, 1997)は、サイトシグナル研究所より分与される。また AML14.3D10(Baumann MA et al, The AML14 and AML14.3D10 cell lines: a long-overdue model for the study of eosinophils and more. *Stem Cells*, 16, 16-24, 1998)は、米国オハイオ州、Research Service, VA Medical Center Dayton の Paul CC より、商業的に入手可能である。

その他、未分化白血球細胞株である HL-60 クローン 15 (ATCC CRL-1964) は、酪酸存在下で 1 週間程度培養すれば、好酸球に分化し好酸球細胞株とすることができます。好酸球であることは、形態的に、多形核で好酸球顆粒が認められることにより判別することができる。形態的な観察は、ギムザ染色やディフクイック染色によって行われる。一般に、好酸球を含むヒト白血球細胞株は、白血病の患者サンプルから不死化した細胞をクローニングすることにより樹立することができる。したがって、当業者は、必要に応じて好酸球細胞株を公知の方法によって得ることもできる。

本発明のスクリーニング方法は、まず前記株化白血球細胞に候補化合物を添加する。その後、該株化白血球細胞における指標遺伝子の発現レベルを測定し、該遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する。

なお本発明のスクリーニング方法において、指標遺伝子の発現レベルは、この遺伝子がコードする蛋白質の発現レベルのみならず、対応する mRNA を検出することにより比較することもできる。mRNA によって発現レベルを比較するには、蛋白質試料の調製工程に代えて、先に述べたような mRNA 試料の調製工程を実施する。mRNA や蛋白質の検出は、先に述べたような公知の方法によって実施することができる。

更に指標遺伝子の転写調節領域を取得し、レポーターアッセイ系を構築することができる。レポーターアッセイ系とは、転写調節領域の下流にこの転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子の発現量を指標として、該転写調節領域

に作用する転写調節因子をスクリーニングするアッセイ系をいう。

すなわち本発明は、次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子が、インターベクチン2、またはインターベクチン2と機能的に同等な遺伝子である方法に関する。

- (1) 指標遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、
- (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および
- (3) 対照と比較してレポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

転写調節領域としては、プロモーター、エンハンサー、さらには、通常プロモーター領域に見られる CAAT ボックス、TATA ボックス等を例示することができる。またレポーター遺伝子としては、CAT(chloramphenicol acetyltransferase)遺伝子、ルシフェラーゼ(luciferase)遺伝子、成長ホルモン遺伝子等を利用することができる。

指標遺伝子の転写調節領域は、次のようにして取得することができる。すなわち、まず指標遺伝子の塩基配列に基づいて、BAC ライブラリー、YAC ライブラリー等のヒトゲノム DNA ライブラリーから、PCR またはハイブリダイゼーションを用いる方法によりスクリーニングを行い、該 cDNA の配列を含むゲノム DNA クローンを得る。得られたゲノム DNA の配列を基に、指標遺伝子の転写調節領域を推定し、該転写調節領域を取得する。得られた転写調節領域を、レポーター遺伝子の上流に位置するようにクローニングしてレポーターコンストラクトを構築する。得られたレポーターコンストラクトを培養細胞株に導入してスクリーニング用の形質転換体とする。この形質転換体に候補化合物を接触させ、レポーター遺伝子の発現を検出することによって、転写調節領域に対する候補化合物の作用を評価することができる。

指標遺伝子の発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、指標遺伝子

の発現レベルを変化させる化合物のスクリーニングを行うことができる。本発明は、次の工程を含む指標遺伝子の発現レベルを変化させる化合物のスクリーニング方法に関する。

すなわち本発明は、*in vivo* および／または *in vitro* において、候補化合物が指標遺伝子の発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを低下させる化合物を選択する工程を含む、指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物のスクリーニング方法に関する。

あるいは本発明は、指標遺伝子の転写調節領域を利用するレポーターアッセイによる、転写調節領域に作用する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明によるレポーターアッセイの結果に基づいて、対象と比較してレポーター遺伝子の発現を低下させる化合物を選択することにより、指標遺伝子の発現を抑制する化合物を取得することができる。

in vitro での本発明によるスクリーニング方法として、指標蛋白質の活性に基づくスクリーニング方法を利用することもできる。すなわち本発明は、次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子がインターベクチン2またはインターベクチン2と機能的に同等な遺伝子である方法に関する。

- (1) 指標遺伝子によってコードされる蛋白質と候補物質を接触させる工程、
- (2) 前記蛋白質の活性を測定する工程、および
- (3) 対照と比較して前記蛋白質の活性を低下させる化合物を選択する工程

本発明における指標蛋白質であるインターベクチン2は、ESEとしての活性を行する。これらの活性を指標として、その活性を阻害する活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。

ESEとしての活性は、たとえば Clathrin-mediated endocytosis を測定することで評価することができる。細胞の生物学的な応答を指標として、Clathrin-mediated endocytosis を測定する方法(Mol. Biol. Cell, 8, 2003-2015, 1997)等が

公知である。ESE としての活性を評価するための公知の方法として、トランスフェリン吸収試験(Transferrin Uptake Assay)のプロトコルを以下に示す。

まず被験蛋白質を発現するベクターで形質転換した細胞を用意する。細胞には COS 7 細胞等が用いられる。形質転換した COS7 細胞は、血清を含まない DMEM で 36 時間程度インキュベートする。次いで、ビオチン標識トランスフェリン (25 μ g/mL) を含む DMEM で 1 時間程度培養する。培養後の細胞のトランスフェリンの取り込みレベルを、アビチン標識イソチオシアネートなどでビオチンを可視化することにより評価する。被験蛋白質を MYC タグなどとの融合蛋白質として発現させれば、被験蛋白質の局在も評価することができる。被験蛋白質とビオチン標識トランスフェリンが同じ部分に局在していれば、被験蛋白質がフェリチンの取り込みを促進していることが証明される。つまり、ESE 活性を有すると評価することができる。

上記の評価方法を利用して、本発明のスクリーニングを行うためには、ビオチン標識トランスフェリンを与える前に細胞を候補物質に接触させるか、または候補物質の存在下でビオチン標識トランスフェリンを細胞に接触させる。候補物質との接触によって、トランスフェリンの取り込みレベルが変化すれば、その候補物質は蛋白質の活性を変化させる活性を有すると判定される。候補物質と接触させない対照と比較して、トランスフェリンの取り込みを低下させる化合物を選択することにより、本発明のスクリーニング方法を行うことができる。

このようにして得ることができる化合物は、インターベクチン 2 の働きを抑制する。その結果、好酸球細胞において発現が誘導された指標蛋白質の阻害を通じて、アレルギー性の免疫応答を制御することができる。

本発明による各種のスクリーニング方法に必要な、ポリヌクレオチド、抗体、細胞株、あるいはモデル動物は、予め組み合わせてキットとすることができます。より具体的には、たとえば指標遺伝子を発現する細胞と、この遺伝子の発現レベルを測定するための試薬とで構成される。指標遺伝子の発現レベルを測定するた

めの試薬としては、たとえば少なくとも 1 つの指標遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、若しくはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドが用いられる。あるいは、少なくとも 1 つの指標蛋白質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体を試薬として用いることができる。

これらのキットには、標識の検出に用いられる基質化合物、細胞の培養のための培地や容器、陽性や陰性の標準試料、更にはキットの使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。本発明に基づく候補化合物の指標遺伝子の発現レベルに与える影響を検出するためのキットは、指標遺伝子の発現レベルを修飾する化合物のスクリーニング用キットとして利用することができる。

これらの方針に用いる被験候補化合物としては、ステロイド誘導体等既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品のほか、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、またそれらから精製された標品などが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。本発明における指標遺伝子は、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において発現が増加する。したがって、この遺伝子の発現を抑制することができる化合物には、アトピー性皮膚炎の症状を抑える作用が期待できる。本発明のアレルギー性疾患の治療薬は、前記スクリーニング方法によって選択された化合物を有効成分として含み、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合することによって製造することができる。本発明のアレルギー性疾患の治療剤は、アレルギー症状の改善を目的として、経口、あるいは非経口的に投与することができる。

経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

また、投与すべき化合物が蛋白質からなる場合には、それをコードする遺伝子を遺伝子治療の手法を用いて生体に導入することにより、治療効果を達成することができる。治療効果をもたらす蛋白質をコードする遺伝子を生体に導入し、発現させることによって、疾患を治療する手法は公知である。

あるいはアンチセンス DNA は、適当なプロモーター配列の下流に組み込み、アンチセンス RNA 発現ベクターとして投与することができる。この発現ベクターをアレルギー疾患患者の好酸球細胞へ導入すれば、この遺伝子のアンチセンスを発現し、当該遺伝子の発現レベルの低下によってアレルギーの治療効果を達成することができる。好酸球細胞への発現ベクターの導入としては、*in vivo*、あるいは *ex vivo* で行う方法が公知である。

更に、本発明の指標遺伝子の発現産物である蛋白質（すなわち指標蛋白質）の活性を阻害する化合物にも、アレルギーの治療効果が期待できる。たとえば、本発明の指標蛋白質を認識し、その活性を抑制する抗体は、アレルギー性疾患の治療のための薬剤として有用である。蛋白質の活性を抑制する抗体の調製方法は公知である。抗体をヒトに投与する場合には、キメラ抗体やヒト化抗体、あるいはヒト型抗体とすることにより、安全性の高い薬剤とすることができます。

投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき 0.1mg から 500mg の範囲で、好ましくは 0.5mg から 20mg の範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で充分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

図面の簡単な説明

図 1 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における末梢血好酸球数 (cells/ μ L) の分布を示す図。

- 29 -

図2は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における全IgE濃度 (UA/mL) の分布を示す図。

図3は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における1835-17 (インターチェクチン2) 遺伝子の発現量 (copy/ng RNA) の分布を示す図。

図4は、横軸に示した各種サイトカイン存在下で、健常者の末梢血好酸球中で発現される1835-17 (インターチェクチン2) 遺伝子の発現量 (copy/ng RNA、GAPDH補正値) を示す図。

図5は、DNFB投与による炎症性アレルギー反応モデルにおける1835-17 (インターチェクチン2) 遺伝子の発現量を比較した図である。縦軸は、対照 (CONT.)における18s遺伝子で補正したmRNAの定量値を1とする、相対発現量 (Relative Activity)を示す。また、横軸には実験に用いたモデルの種類を示した。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] ディファレンシャルディスプレイ解析

健常者とアトピー性皮膚炎患者の末梢血より単離した血球細胞を比較して、発現変動している新しい治療関連遺伝子あるいは診断に有用な遺伝子を見出すことを目的としてスクリーニングを行った。

(1) 被検者

健常者 (レーン1~6) およびアトピー性皮膚炎 (レーン8~29) の症状、病態、喘息の有無、ダニ特異的IgE値、好酸球数、全IgE値を表1に示す。アレルゲン非特異的 (Total IgE) 、ダニおよびスギ特異的IgEはEIA法により測定した。すなわち、抗ヒトIgE抗体を結合させたキャップに被検血清を反応させ、血清中のアレルゲン非特異的IgE抗体、またはダニ、スギ特異的IgE抗体を結

- 30 -

合させた。次に、 β -D-ガラクトシダーゼ標識抗ヒト IgE 抗体と基質液（4-メチルウンベルフェリル- β -D-ガラクトピラノシド）を加え、反応させて蛍光物質を生成させた。反応停止液を加えて反応を停止させ、同時測定の標準 IgE の蛍光強度より抗体濃度を決定した。LDH の測定は、UV 法（Wroblewski-La Due 法）により、ピルビン酸と NADH の反応による NADH の減少速度を吸光度の減少から算出した。LDH 値の測定には、L タイプワコール LDH（和光純薬）と 7170 型自動分析装置（日立）を用いた。好酸球数は、EDTA 添加血液 2ml を試料として鏡検法と自動血球分析装置 SE-9000（RF/DC インピーダンス方式、Sysmex 製造）により測定した。

表 1

Lane	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	14	18	19	24	26	27	28	29
Blood	120	140	19	20	23	24	36	43	69	90	73	92	56	59	30	46	48	51	60
症状	健常人、極軽症						軽症						中症						重症
病態							○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	●	●	
喘息							軽	軽	な	軽	な	な	な	軽	な	な	な	軽	
							し	し	し	し	し	し	し	し	し	し	し	し	
S IgE	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
好酸球	B	B	B	B	B	A	B	C	C	C	C	C	B	C	C	C	B	C	
T IgE	L	L	L	L	L	L	L	L	L	H	H	L	H	H	L	L	H	H	

表中、病態の「○」は寛解期、「●」は増悪期であることを示す。特異的 IgE (S IgE) は抗ダニ IgE において Class 0~2 を「-」、Class 3~6 を「+」とした。全 IgE (T IgE) は 1000 IU/ml 以下を「Low (L)」、1000 IU/ml より大きい場合を「High (H)」とした。好酸球は 3%未満を「A」、3~7%を「B」、7%より大きい場合を「C」とした。

(2) ディファレンシャルディスプレイ解析

健常者、および患者から採取した全血に 3%デキストラン溶液を加えて 30 分室温放置し、赤血球を沈降させた。上層の白血球画分を回収し、フィコール溶液

(Ficoll-Paque PLUS; アマシャムファルマシアバイオテク) の上に載せて 1500rpm、30 分室温で遠心した。下層に回収された顆粒球画分を CD16 抗体磁気ビーズと 4°Cで 30 分反応させ、MACS を用いた分離でトラップさせずに溶出する細胞を好酸球として実験に用いた。

上記のように調製した好酸球を Isogen (日本ジーン；和光純薬) に溶解し、この溶液から、Isogen に添付されているプロトコルに従って RNA を分離した。クロロホルムを加え、攪拌遠心して水層を回収した。次にイソプロパノールを加え、攪拌遠心して沈殿の全 RNA を回収した。回収した全 RNA は、DNase (日本ジーン；和光純薬) を加えて 37°C15 分反応させ、フェノール-クロロホルム抽出してエタノール沈殿で RNA を回収した。

このように調製した全 RNA を用いて蛍光ディファレンシャルディスプレイ (Fluorescent Differential Display, 「DD」と略記する) 解析を行った。DD 解析は文献 (T.Ito ら, 1994, FEBS Lett. 351: 231-236) に記載の方法に準じて行った。まず全 RNA を逆転写し、cDNA を得た。第一次 DD-PCR 反応用には 3 種のアンカープライマーの各々について全 RNA の各 0.2 μg を用いて cDNA を調製した。第二次 DD-PCR 反応用には、3 種のアンカープライマーの各々について RNA 0.4 μg を用いて cDNA を調製した。いずれの cDNA も、0.4ng/μl RNA 相当の最終濃度に希釈し、実験に用いた。1 反応あたり 1ng RNA 相当の cDNA を用いて DD-PCR 反応を行った。反応液の組成は表 2 の通りである。

表 2

cDNA(0.4ng/μl RNA 相当)	2.5 μl
任意プライマー (2 μM)	2.5 μl
10 × AmpliTaq PCR バッファー	1.0 μl
2.5mM dNTP	0.8 μl
50 μM アンカープライマー (GT15A, GT15C, GT15G)	0.1 μl
Gene Taq (5U/μl)	0.05 μl
AmpliTaq (5U/μl)	0.05 μl
dH ₂ O	3.0 μl
総量	10.0 μl

PCR の反応条件は、「95°C3 分、40°C5 分、72°C5 分」を 1 サイクル、続いて、「94°C15 秒、40°C2 分、72°C1 分」を 30 サイクルの後、72°C5 分、その後連続的に 4°C にした。

使用したプライマー対はアンカープライマーである GT15A (配列番号 : 2) 、 GT15C (配列番号 : 3) 、および GT15G (配列番号 : 4) に対して任意プライマーをそれぞれ AG 1~110、AG 111~199、および AG 200~287 を組み合わせ、計 287 組の反応をおこなった。なお、任意プライマーとしては GC 含量 50% の 10 ヌクレオチドからなるオリゴマーを設計し、合成して用いた。

ゲル電気泳動は、6% 変性ポリアクリルアミドゲルを作製し、2.5 μ l の試料をアプライし、40W で 210 分間泳動した。その後、日立製蛍光イメージアナライザ FMBIO II を用いてゲル板をスキャンし、蛍光検出によって泳動画像を得た。

健常者と患者の両サンプルを並べて泳動し、各試料間で発現の変動するバンドを分離した。目視判定により選抜され、重要検定にて 0.1 以下のバンドについて配列を決定した。更に画像解析ソフト Bio-Image を用いて選抜されたバンドについても配列を決定した。各バンドにおける同配列クローンをグループ化しコンセンサス配列とした。この結果、配列決定したバンドのうち一意的に「dominant 配列」が定義できるバンドを選別した。

選別されたコンセンサス配列を query として GCG 上で genembl、dbEST に対し BLAST による相同意検索を行った。ここで identity95% 以上を「有意な相同意有り」と判断した。

このような解析の結果、患者で特異的に発現が上昇するバンドを同定した。同定された「1835-17」のバンドの増幅に用いたプライマーセットを表 3 に示す。任意プライマーの配列に付けた () 内の番号は、配列番号である。また「1835-17」のバンドの塩基配列は配列番号 : 1 に示す。

表 3

Band ID	bp	アンカープライマー	任意プライマーの名前	任意プライマーの配列（配列番号）
1835-17	365	GT15A	AG00017	CTTGAGCGA(5)

更に、断片「1835-17」の塩基配列（配列番号：1）を query として、GenBank に対し BLAST による相同意性検索を行った。その結果、配列番号：1 の塩基配列が、ヒトのインターチェン 2 の塩基配列とほぼ一致した。このことから、先に同定された断片「1835-17」の塩基配列は、ヒト・インターチェン 2 の部分配列であることを確認した。ヒトのインターチェン 2 がアレルギー性疾患の好酸球において発現が上昇することは本発明者らによって見出された新規な知見である。この知見に基づいて、ヒト・インターチェン 2 がアレルギー性疾患の指標遺伝子として有用であることが裏付けられた。

[実施例 2] ABI7700 による発現定量

実施例 1 で同定された遺伝子の発現を、ABI7700 を用いた TaqMan 法により解析した。新たに健常者、アトピー性皮膚炎患者の軽症、中症、重症各 10 検体から好酸球を収集し、実施例 1 と同じように RNA を調製した。健常者、患者の検査値 profile を表 4 に示す。実施例 1 で同定したバンド、並びに補正用内部標準として既知遺伝子である β -アクチン(actin)について発現レベルを定量した。

表 4

連番	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Blood											80	109	125	130	131	164	170	197	205	215
症状											なし									
病態											なし									
喘息											なし	なし	なし	軽	軽	軽	なし	軽	なし	軽
ダニ IgE											-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
好酸球	B	B	B	A	B	B	B	A	A	B	C	B	B	C	C	C	C	C	C	
全 IgE								L			L	L	H	H	L	L	L	L	L	
連番	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Blood	101	147	162	179	196	210	218	219	226	232	96	135	146	167	184	194	211	225	227	238
症状											中症									
病態	○	○	○	●	●	●	●	●	○	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	
喘息	なし	なし	なし	軽	なし	軽	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	軽	なし	なし	軽	なし	なし	
ダニ IgE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
好酸球	B	C	C	B	A	C	C	B	C	A	B	C	B	B	C	C	C	C	C	
全 IgE	H	L	H	H	L	H	H	L	L	L	L	H	H	L	H	H	H	H	H	

健常者、アトピー性皮膚炎患者の軽症、中症、重症各 10 検体の検査値プロファイルを基に、各群の検査値をプロットしたのが図 1 (好酸球数) および図 2 (全 IgE) である。アトピー性皮膚炎患者の好酸球数の評価ランクは B～C となっているが、実際の測定値で比較すると、重症者の測定値のみが突出していることが図 1 から明らかである。このことは、好酸球数は、軽症、あるいは中症のアトピー性皮膚炎の診断指標としては利用しにくいことを示している。

全 IgE の測定値 (図 2) についても同様の傾向が見られる。すなわち全 IgE 値の顕著な上昇が見られるのは、重症患者であり、軽症～中症の患者においては健常者と大きな違いは見られない。したがって全 IgE 値も、軽症のアレルギー性疾患の指標としにくいことがわかる。

ABI 7700 による測定に用いたプライマーおよびTaqMan プローブは、遺伝子の配列情報に基づいて Primer Express (PE バイオシステムズ) により設計した。TaqMan プローブの 5'末端は FAM(6-carboxy-fluorescein) で、また 3'末端は TAMRA(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine) で標識されている。

- 35 -

実験に用いたプライマー、およびTaqMan probe の塩基配列は、表5に記載の配列番号に示すとおりである。 β アクチン測定用のプライマーとプローブには、TaqMan β -actin Control Reagents (PEバイオシステムズ) に添付のものを用いた。測定結果を図3に示す。また、臨床サンプルでの遺伝子発現量の平均 (AVERAGE: copy/ng(補正値)) を表6にまとめた。

表5

ID	フォワード	リバース	probe
1835-17	6	7	8
β -actin	9	1 0	1 1

表6

臨床サンプルでの遺伝子発現量 (AVERAGE: copy/ng(補正値))

Band ID	健常者	軽症	中症	重症
1835-17	1520	5106	3107	3226

上記のデータを利用して、パラメトリック多重比較検定、およびノンパラメトリック多重比較検定を行った。統計解析は、The SAS SYSTEM の SAS 前臨床パッケージ Version 4.0 (SAS Institute Inc.)を用いて行った。結果を表7に示す。

表7から明らかなように、本発明で同定された遺伝子はアトピー性皮膚炎（軽症）により発現が有意に上昇している。つまり、この遺伝子の発現を測定することが、アトピー性皮膚炎において診断的価値を持つことを裏付けている。

表7

Band ID	パラメトリック多重比較			
	Dunnet	p 値	Tukey	p 値
B1835-17	軽症 > 健常	0.0037	軽症 > 健常	0.0068
ノンパラメトリック多重比較				
	Dunnet	p 値	Tukey	p 値
B1835-17	軽症 > 健常	0.0071	軽症 > 健常	0.0132

[実施例3] 各種血液細胞での指標遺伝子の発現

5人の健常者の末梢血から分離した細胞での遺伝子の発現を調べた。好酸球(E)の分離は上記の通り行った。好中球(N)は好酸球を溶出させた後、CD16抗体磁気ビーズでトラップされた細胞を磁界から外して溶出、回収して調製した。一方、フィコール遠心分離で中間層に回収される単球画分を、MACS CD3抗体磁気ビーズにより溶出画分(M:monocyteとB cellの混合物)とトラップされる画分(T cell画分)に分離した。次に、溶出画分をMACS CD14抗体磁気ビーズにより、溶出画分(B cell画分)とトラップされる画分(moocyte画分)に分け、それぞれを精製T細胞、精製B細胞、そして精製単球とした。

好酸球はIsogen、好中球、T細胞、B細胞、そして単球はRNeasy (Qiagen)を用いて可溶化し、全RNA抽出、DNase処理後(方法は前述の通り)遺伝子発現解析に供した。用いたプライマー、プローブ等は上記と同一である。これらの血球細胞での平均発現量(AVERAGE: copy/ng(補正值))は表8に示す通りであった。

表8

各種血球細胞での遺伝子発現量(AVERAGE: copy/ng(補正值))

Band ID	好酸球	好中球	B細胞	T細胞	単球
1835-17	6813	6573	1621	1427	693

[実施例4]ヒト末梢血好酸球のサイトカイン刺激による遺伝子の発現変化

好酸球はアレルギー性炎症における中心的な炎症細胞と考えられているので、その増殖、分化、局所への遊走・集積、及び活性化に関するサイトカインの遺伝子発現への影響を検討した。

健常者の末梢血100mLから分離した好酸球でのサイトカイン刺激による遺伝子発現の変化を調べた。好酸球の分離は上記の通りに行った。24穴シャーレ上に好酸球を 1×10^6 /mLまいた。シャーレは、好酸球の吸着による活性化を防ぐことを目的として、予め1%BSA(非動化ブロッキングバッファー)により室温で2時間かけてコートした。サイトカインとしてインターロイキン5(IL-5)、

インターロイキン4 (IL-4) 、インターフェロン γ (IFN γ) 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 並びにエオタキシン (eotaxin) を、各々、0.1、1、及び 10ng/ml ずつシャーレの各ウェルに添加し、10%FCS を補った DMEM 中で 3 時間培養した。これらのサイトカイン類は、いずれも好酸球の活性化やアレルギーの発症に関わるとされるサイトカイン類である。

各処理を行った好酸球について、実施例 1 と同じように RNA を調製し、遺伝子発現解析に供した。用いたプライマー、プローブ等は上記と同一である。培養 3 時間後の結果を図 4 (RNA 1 ng 当たりのコピー数を GAPDH で補正した値) に示す。

実験に用いたサイトカイン類のうち、IL-5 は好酸球を活性化し好酸球の寿命を延ばす。そのため IL-5 処理は、好酸球において抗アポトーシス遺伝子の bcl-2 や bax の発現レベルの上昇をもたらす。図 4 に示すように「1835-17」 (インターチェクチン 2 遺伝子) も同様に上昇しているので、好酸球の寿命延長と相関して発現すると考えられ、アレルギーの病態の誘導や増悪との関連性が示唆された。

また「1835-17」 (インターチェクチン 2 遺伝子) は、IFN γ や IL-4 によっても発現が誘導された。これらのサイトカイン類については、好酸球における遺伝子発現に関する知見はこれまであまりない。しかし、いずれもアレルギーの発症にとって重要な因子であることから、これらのサイトカインで好酸球において発現が誘導される遺伝子であるということは、「1835-17」 (インターチェクチン 2 遺伝子) が、アレルギー性疾患の病態や増悪に関連している可能性を示唆するものと考えられた。

[実施例 5]

アレルギー反応のモデルとして、2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 塗布マウスを用い、マウスにおけるインターチェクチン 2 遺伝子の発現レベルの変化を観察した。DNFB は、マウス等の実験動物において、アレルギー性の皮膚炎反応

をもたらすハプテンとして用いられる物質である。

次の組成からなる感作液を調製した。

アセトン：オリーブ油 = 4 : 1 (=2mL:500 μ L)、

DNFB 0.4% (=10 μ l)

また Challenge 液は、次の組成のとおりとした。

アセトン：オリーブ油 = 4 : 1 (=2mL:500 μ L)、

DNFB 0.2% (=5 μ l)

投与スケジュールは、以下のとおりである。

0 日目：腹部の毛をバリカンで刈って、感作液 25 μ L を腹部に塗る。

1 日目：前日と同様に感作液 25 μ L を腹部に塗る。

5 日目：両耳に Challenge 液を 5 μ L/片耳塗る。

6 日目：耳の肥厚を確認して、TRIZOL Reagent のプロトコールにしたがって RNA を抽出する。

対照として、DNFB を除いた溶媒のみを塗布したコントロールマウス (CONT.マウス) を用意した。また DNFB 塗布前にステロイドを経口投与したマウス(DS マウス)についてもインターベクチン 2 遺伝子の発現を観察した。具体的には、0 日目から 6 日目までの毎日、DNFB を塗布する場合は塗布前 30 分にステロイドを経口投与した。ステロイド剤としては、プレドニゾロンを 1 mg/mL にメチルセルロースで調整したものを、0.1 mL/1.0 g マウスで経口投与した。同時に、DNFB を塗布しないでステロイド (プレドニゾロン) のみを経口投与したマウス (S マウス) についても、インターベクチン 2 遺伝子の発現を観察した。

インターベクチン 2 遺伝子の発現レベルは、マウス耳組織から抽出した mRNA をサンプルとして、ABI7700 を利用した TaqMan 法 (前述) によって定量した。TaqMan 法に用いたプライマーとプローブの塩基配列を以下に示す。この実験に用いたプライマーとプローブは、マウスのインターベクチン 2 遺伝子

- 39 -

(EMBO J. 18 (5), 1159-1171 (1999))をコードすると予測される塩基配列 (GenBank Accession No AF132480)に基づいてデザインした。

プライマー

1835-1F:5-ACCAGCAAGAGTTCTCTATAGCTATG-3／配列番号：1 2

1835-1R:5-CTGTAAGATGATGCATGAGGCAATGT-3／配列番号：1 3

TaqMan probe

1835-17:5-famTCATCAGCCATTGCCTCCAGTTGCACCTamura-3／配列番号：1 4

PCR は、One-step RT-PCR Master Mix Reagents (PE Biosystems) を用いて、x2 Master Mix without UNG を 25 μ L、x40 MultiScribe and Rnase Inhibitor Mix を 1.25 μ L、10 μ M primer 0.25 μ L、4 μ M TaqMan Probe を 0.625 μ L、これに RNA(2ng) + DEPC で 50 μ L とする。サイクルは、94 度 5 分、「94 度 30 秒・55 度 30 秒・72 度 1 分」を 40 回行った。検量線用には 50ng、10ng、2ng、0.4ng、および 0.08ng の 5 倍の段階希釈を用意した。試料中の cDNA 濃度の差を補正するため、18S 遺伝子について同様の定量解析を行い、目的とする遺伝子の値を 18S の値で割り、CONT. の値を 1 として表示した。

CONT.：コントロールマウス、DNFB.：DNFB 塗布マウス、D/S：DNFB 塗布マウスにステロイド投与マウス、および S：ステロイド投与マウスを、各 4 匹づつ用い、得られた結果を t-検定（等分散を仮定した 2 標本による検定）で検定した。結果は、表 9 のとおりである。更にこの結果を図 5 に示した。

表 9

	average	S.E.M.
CONT.	1.00	0.00
DNFB	2.04	0.28
D/S	1.51	0.07
S	1.04	0.05

対照である CONT. と DNFB 塗布群、および対照とステロイドを投与した DNFB 塗布群(D/S)との間で $p < 0.05$ で有意差が認められた。マウスのインターベクチン 2 遺伝子は、炎症性アレルギーモデルで上昇することが確認できた。このことは、インターベクチン 2 遺伝子とアレルギー反応との密接な関連を裏付けている。特にステロイドを投与したモデルにおいてもインターベクチン 2 遺伝子の有意な発現上昇が見られたことは、この遺伝子がアレルギー反応の原因と関連していることを強く示唆する。つまり、インターベクチン 2 遺伝子はアレルギー性の反応の結果として誘導されたものではない。したがって、インターベクチン 2 遺伝子は、アレルギー性疾患の治療や予防における標的分子として有用である。

産業上の利用の可能性

本発明により、初期アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加する遺伝子が提供された。好酸球の増加に先だって発現が高まる遺伝子は、アレルギー症状の、きわめて鋭敏な指標として利用することができる。好酸球の増加が見られない段階でアレルギー症状を診断することは、通常は困難である。しかし本発明によって提供された指標は、これまでの診断指標では困難な早期の診断を可能とする。早期の診断が可能となつことにより、初期アレルギー性疾患であっても、的確な治療方法を選択することができる。

好酸球の増加はアレルギー反応の重要なステップである。したがって、好酸球

の増加に先だって、好酸球において発現が増加する遺伝子は、アレルギー性疾患の、特に初期の段階において重要な役割を果たしていると考えられる。したがって本発明における指標遺伝子の発現や活性を抑えることがアレルギー性疾患の治療戦略のターゲットとなるとともに、そのような新しい治療法におけるモニタリングのための新しい臨床診断指標としての有用性が期待できる。

本発明によって提供された指標遺伝子は、アレルゲンの種類に関わらず、簡便にその発現レベルを知ることができる。したがって、アレルギー反応の病態を総合的に把握することができる。

また本発明によるアレルギーの検査方法は、末梢血好酸球を試料としてその発現レベルを解析することができるので、患者に対する侵襲性が低い。しかも遺伝子発現解析に関しては、たとえばECPなどの蛋白質測定と異なって、微量サンプルによる高感度な測定が可能である。遺伝子解析技術は、年々ハイスクール化、低価格化が進行している。したがって本発明によるアレルギーの検査方法は、近い将来、ベッドサイドにおける重要な診断方法となることが期待される。この意味でこれらの病態関連遺伝子の診断的価値は高い。

請求の範囲

1. 次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法であつて、指標遺伝子がインターチェクチン 2 またはインターチェクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である方法。
 - a) 被検者の生体試料における、指標遺伝子の発現レベルを測定する工程
 - b) 健常者の生体試料における指標遺伝子の発現レベルと比較する工程
2. アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項 1 に記載の検査方法。
3. 遺伝子の発現レベルを、cDNA の PCR によって測定する請求項 1 に記載の検査方法。
4. 遺伝子の発現レベルを、前記遺伝子によってコードされる蛋白質の検出によって測定する請求項 1 に記載の検査方法。
5. 生体試料が末梢血好酸球細胞を含む試料である請求項 1 に記載の方法。
6. インターチェクチン 2 またはインターチェクチン 2 と機能的に同等な遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬。
7. インターチェクチン 2 またはインターチェクチン 2 と機能的に同等な遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体からなる、アレルギー性疾患検査用試薬。
8. 次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であつて、指標遺伝子がインターチェクチン 2 またはインターチェクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である方法。
 - (1) 指標遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程
 - (2) 指標遺伝子の発現レベルを測定する工程、および
 - (3) 対照と比較して指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択す

る工程

9. 細胞が好酸球細胞である請求項 8 に記載の方法。
10. 次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であつて、指標遺伝子がインターベクチン 2 またはインターベクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である方法。
 - (1) 被験動物に候補化合物を投与する工程、
 - (2) 被験動物の生体試料における指標遺伝子の発現強度を測定する工程、および
 - (3) 対照と比較して指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程
11. 次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であつて、指標遺伝子がインターベクチン 2 またはインターベクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である方法。
 - (1) 指標遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、
 - (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および
 - (3) 対照と比較して前記レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程
12. 次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であつて、指標遺伝子がインターベクチン 2 またはインターベクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である方法。
 - (1) 指標遺伝子によってコードされる蛋白質と候補物質を接触させる工程、
 - (2) 前記蛋白質の活性を測定する工程、および
 - (3) 対照と比較して前記蛋白質の活性を低下させる化合物を選択する工程
13. 請求項 8、請求項 10、請求項 11、および請求項 12 のいずれかに記載

のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患の治療薬。

14. 指標遺伝子、またはその一部のアンチセンス DNA を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬であって、指標遺伝子がインターベクチン 2 またはインターベクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である治療薬。

15. 指標遺伝子によってコードされる蛋白質に結合する抗体を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬であって、指標遺伝子がインターベクチン 2 またはインターベクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である治療薬。

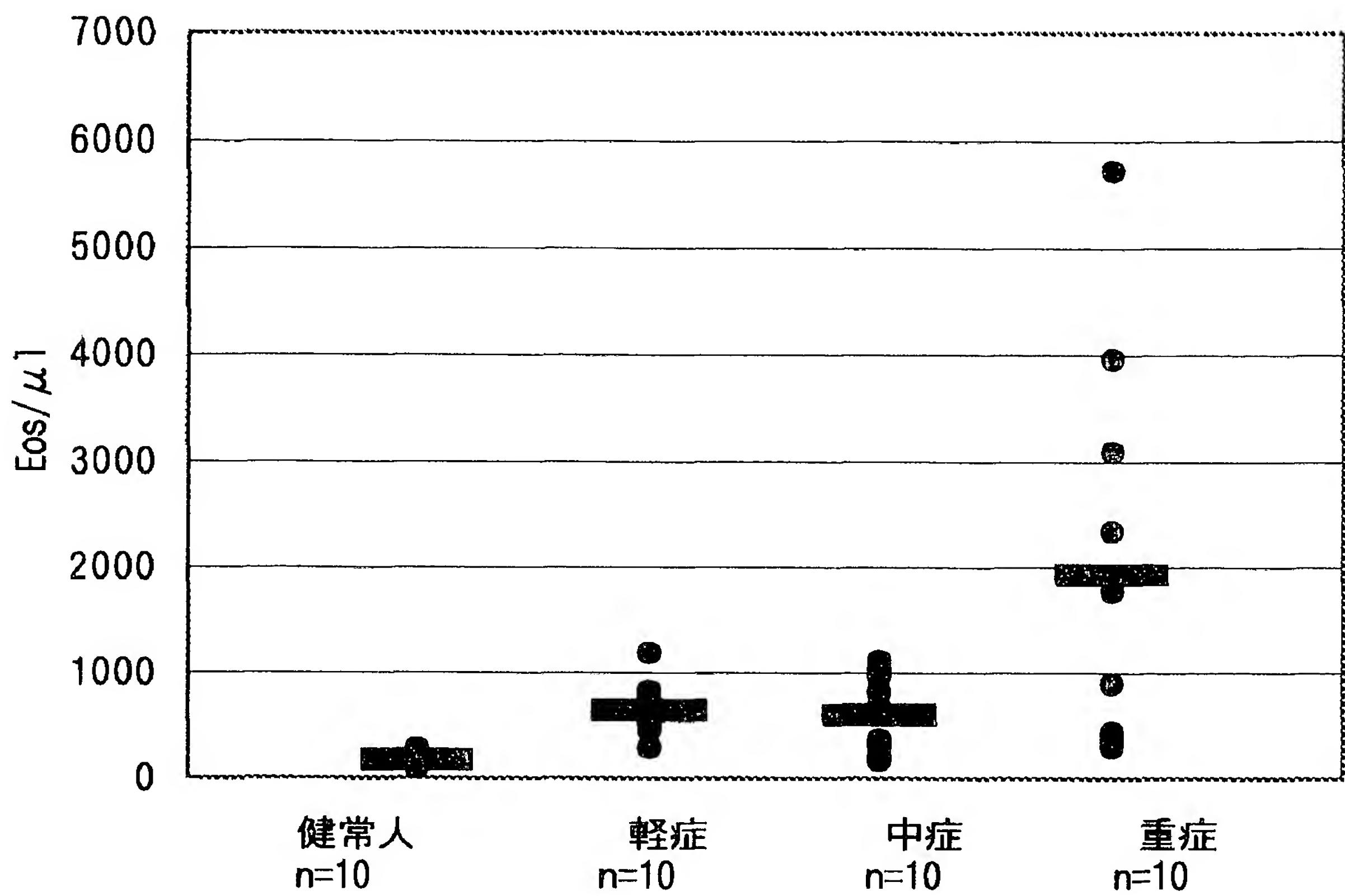
16. 指標遺伝子の好酸球細胞における発現強度を上昇させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物のアレルギー性疾患のモデル動物としての使用であって、指標遺伝子がインターベクチン 2 またはインターベクチン 2 と機能的に同等な遺伝子である使用。

17. 指標遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドと、指標遺伝子を発現する細胞からなる、アレルギー性疾患の治療薬をスクリーニングするためのキットであって、指標遺伝子がインターベクチン 2 またはインターベクチン 2 と機能的に同等な遺伝子であるキット。

18. 指標遺伝子によってコードされるアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体と、指標遺伝子を発現する細胞からなる、アレルギー性疾患の治療薬をスクリーニングするためのキットであって、指標遺伝子がインターベクチン 2 またはインターベクチン 2 と機能的に同等な遺伝子であるキット。

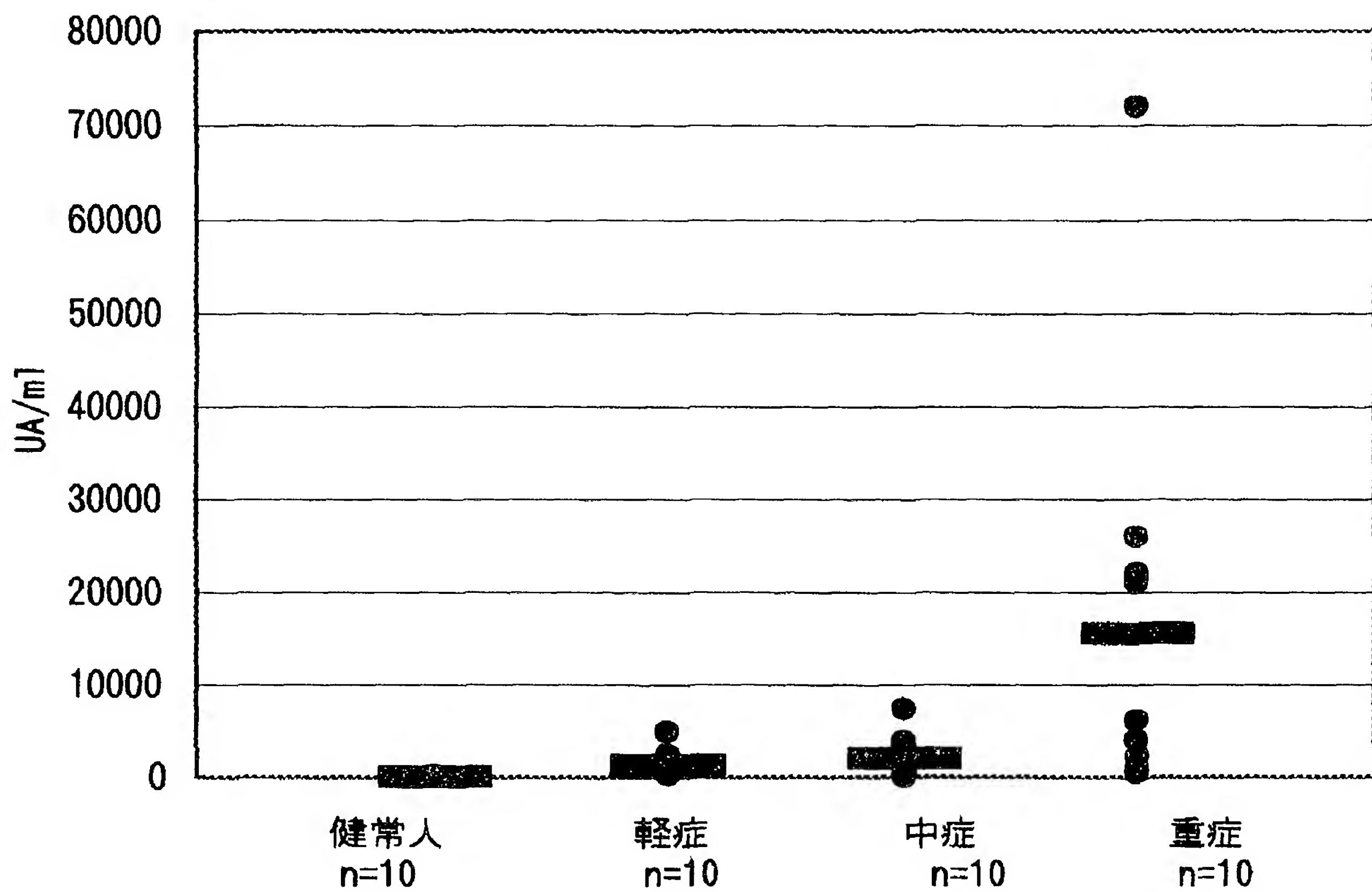
1 / 5

図 1



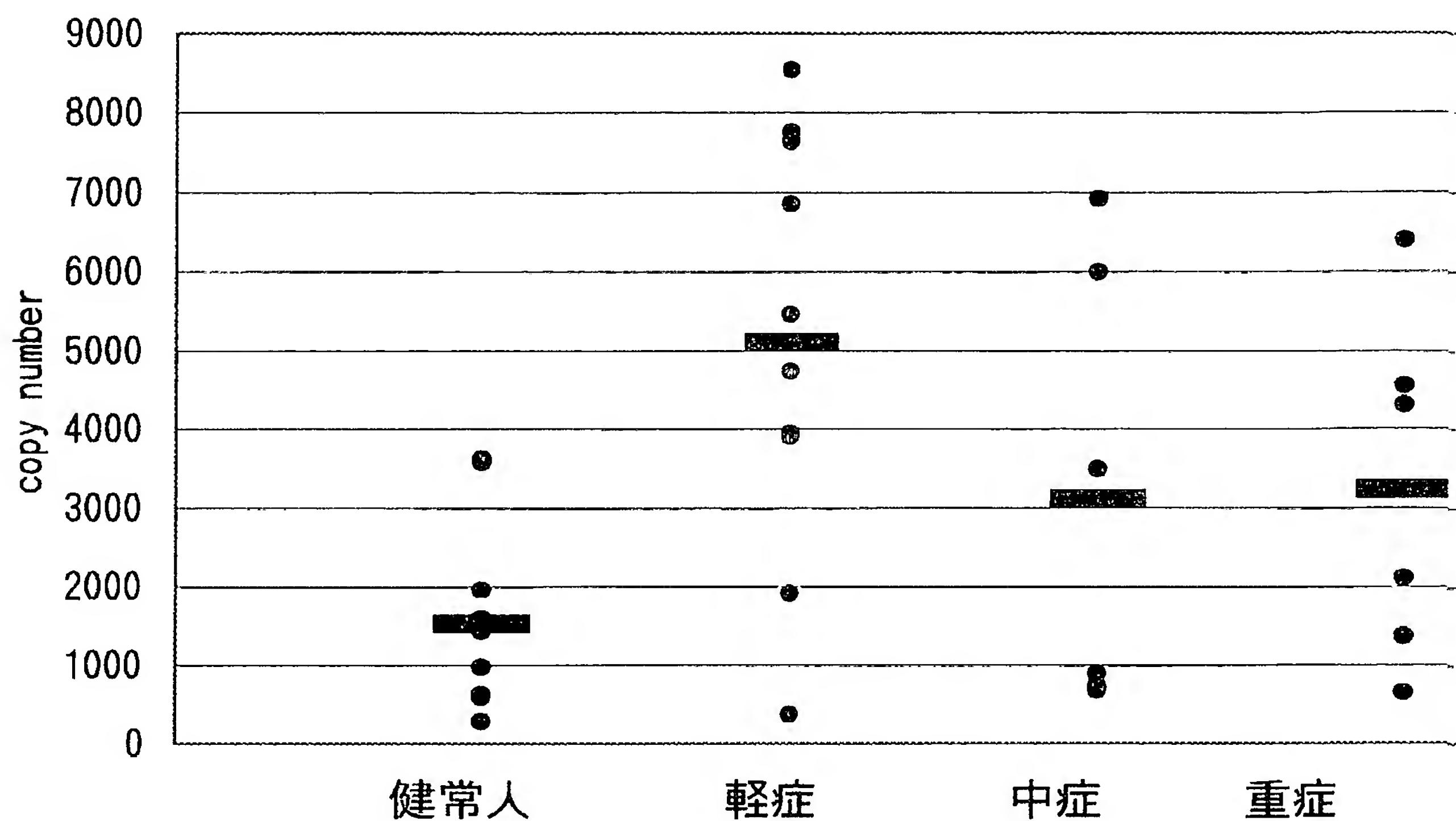
2 / 5

図 2



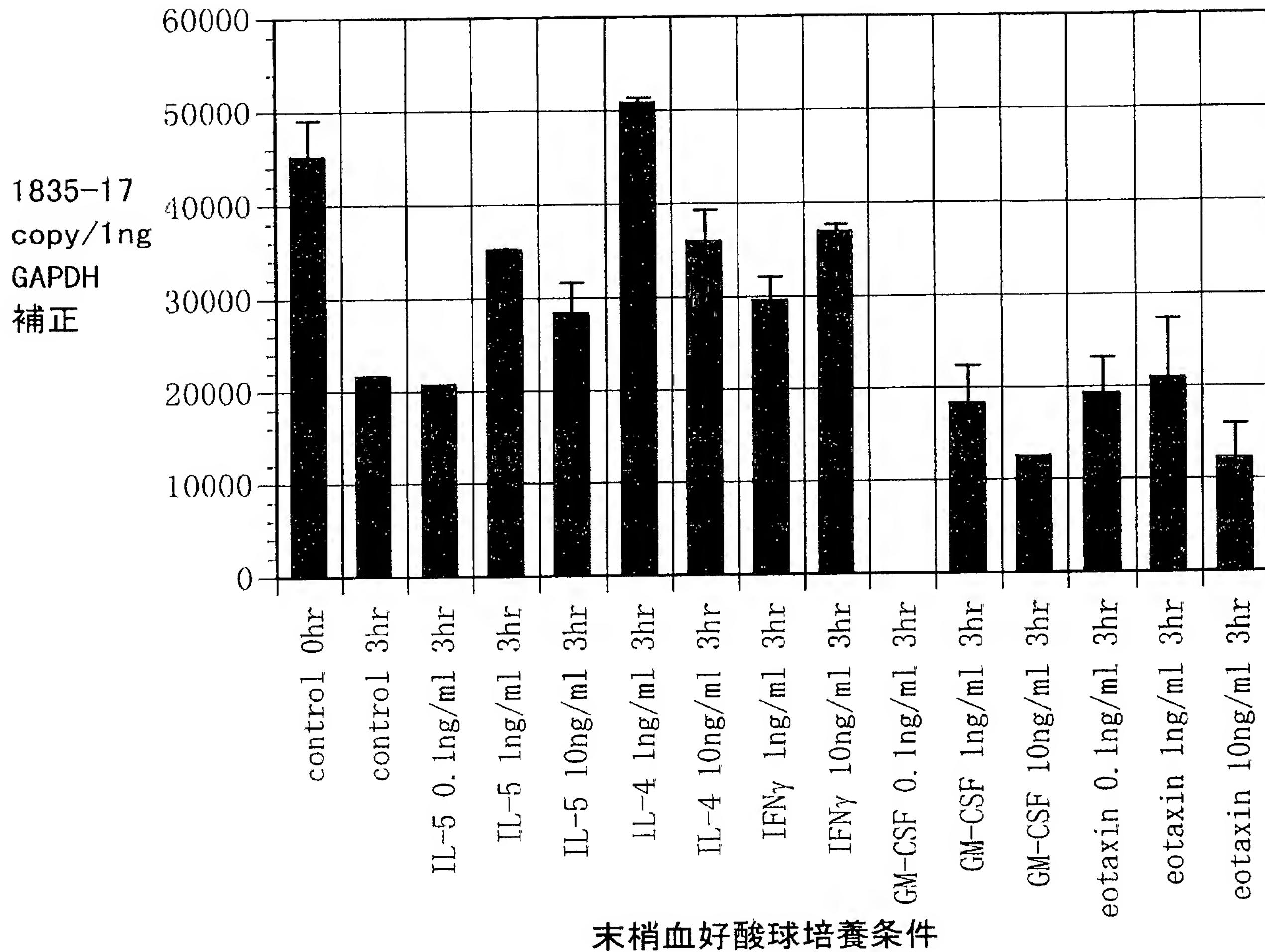
3 / 5

図 3



4 / 5

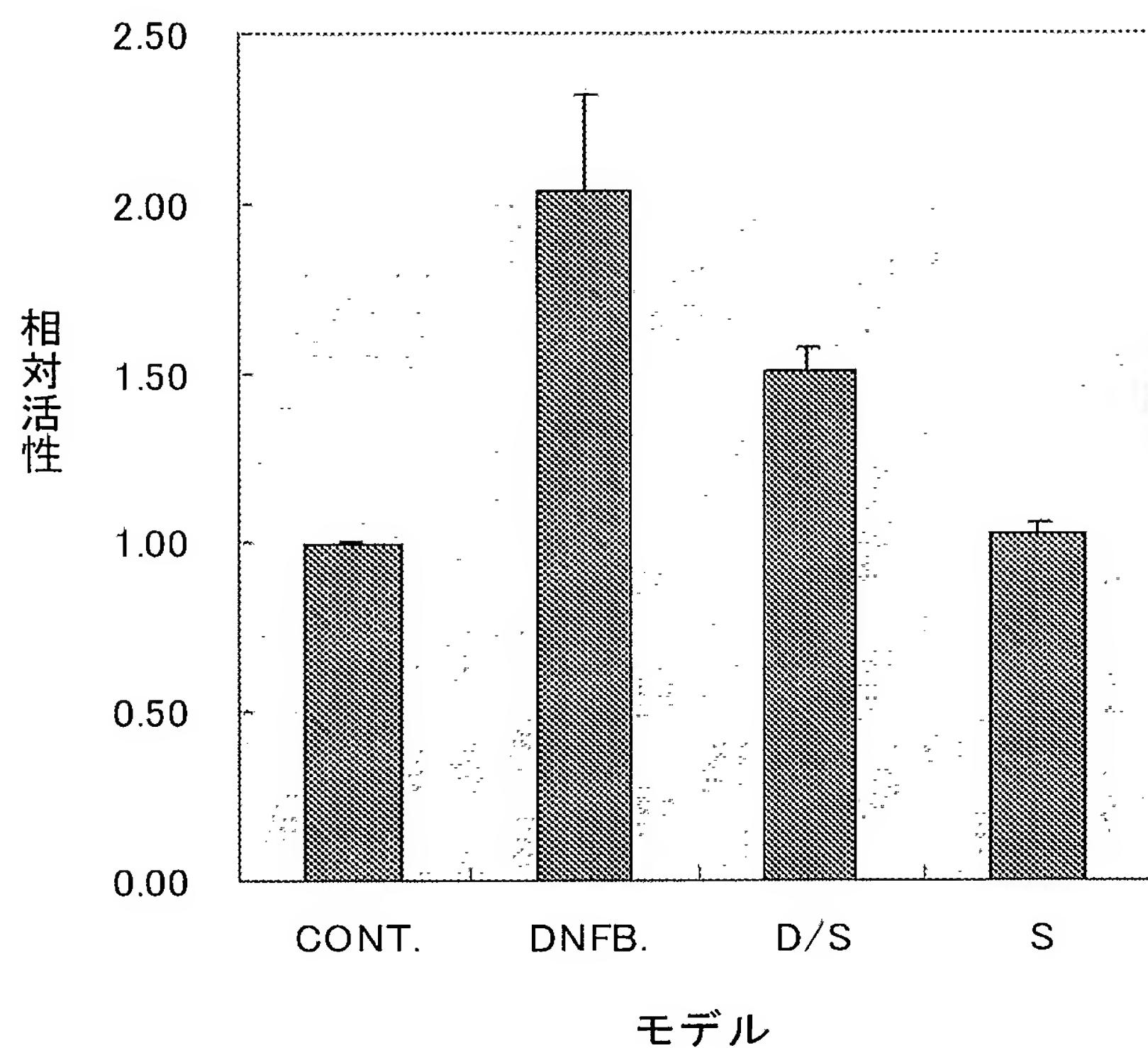
図 4



5 / 5

図 5

1835-17



SEQUENCE LISTING

<110> GENOX RESEARCH, INC.

JAPAN AS REPRESENTED BY GENERAL DIRECTOR OF NATIONAL CHILDREN'S HOSPITAL

<120> Method for examination of allergosis

<130> GI-A0006P2

<140>

<141>

<150> JP 2000-314093

<151> 2000-10-13

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<100> 1

gagtttaacc tgacaatttc ttcttgttct ctattttttt gattgagaag ctccgtcgc 60
cgaattctct cccattctaa gcgacgttgt cgttcaagtt cctgtttgc tgccctctgt 120
ctttctatgt cttttctctt ttcttcctct cgttgtctct ccaattcccg ttgcttctct 180
aagcgaaaaa ctaattcaag ttgttttttc cattttttttt cttgtaatcc tctctgtttt 240
cgttcccaact ttcccttttc tttctggcgt ttacgttctg cctccctttg ttgctgctcc 300
atcaaggcgtt ggcgtcgtttt ttccagctcc atgttccc 338

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized anchor primer sequence

<400> 2

gtttttttttt tttttta

17

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized anchor primer sequence

<400> 3

gttttttttt ttttttc

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized anchor primer sequence

<400> 4

gttttttttt ttttttg

17

<210> 5

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 5

ctttgagcga 10

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

gccaaactatg agcgaggaa 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

tgttgctgct ccatcaaggc 20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (22)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N, N, N', N'-tetramethylrhodamine)

<400> 8

tggagctgga aaagcgacgc ca

22

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

tcacccacac tgtgcccatc tacga

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 10

cagcggacc gctcattgcc aatgg

25

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (7)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 11

atgcctccccc ccatgcatac ctgcgt

26

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

accagcaaga gtttcttata gctatg

26

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

ctgtaagatg atgcatgagg caatgt

26

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (27)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 14

tcatcagcca ttgcctccag ttgcaccc

27

<210> 15

<211> 5828

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (7)..(5052)

<400> 15

cgccag atg gct gag agc tat caa gga aaa ctc agg acc atg atg gct 48
Met Ala Glu Ser Tyr Gln Gly Lys Leu Arg Thr Met Met Ala

1

5

10

cag ttt ccc aca gct atg aat gga ggg cca aac atg tgg get att acc 96
Gln Phe Pro Thr Ala Met Asn Gly Gly Pro Asn Met Trp Ala Ile Thr

15

20

25

30

tct gaa gaa cgt act aag cat gac agg cag ttt gat aac ctc aaa cct 144
Ser Glu Glu Arg Thr Lys His Asp Arg Gln Phe Asp Asn Leu Lys Pro

35

40

45

tca gga ggt tac ata aca ggt gat caa gca cgt aat ttt ttc cta caa 192
Ser Gly Gly Tyr Ile Thr Gly Asp Gln Ala Arg Asn Phe Phe Leu Gln

50	55	60	
tca ggt ctg ccg gcc cct gtt tta gct gaa ata tgg gct tta tca gac 240			
Ser Gly Leu Pro Ala Pro Val Leu Ala Glu Ile Trp Ala Leu Ser Asp			
65	70	75	
cta aac aag gat ggg aag atg gat cag caa gag ttc tcc ata got atg 288			
Leu Asn Lys Asp Gly Lys Met Asp Gln Gln Glu Phe Ser Ile Ala Met			
80	85	90	
aaa ctc atc aaa ctg aag ctt caa ggc caa cag ttg cct gtg gtt ctc 336			
Lys Leu Ile Lys Leu Lys Leu Gln Gln Gln Leu Pro Val Val Leu			
95	100	105	110
cct cct att atg aag caa ccc cct atg ttt tct cca tta att tct get 384			
Pro Pro Ile Met Lys Gln Pro Pro Met Phe Ser Pro Leu Ile Ser Ala			
115	120	125	
cgt ttt gga atg gga agc atg ccc aat ctg tcc att cct cag cca ttg 432			
Arg Phe Gly Met Gly Ser Met Pro Asn Leu Ser Ile Pro Gln Pro Leu			
130	135	140	
cct cca get gca cct ata aca tca ttg tct tct geg act tca ggg acc 480			
Pro Pro Ala Ala Pro Ile Thr Ser Leu Ser Ser Ala Thr Ser Gly Thr			
145	150	155	

aac ctt cct ccc tta atg atg ccc act ccc cta gtg cct tct gtt agc 528

Asn Leu Pro Pro Leu Met Met Pro Thr Pro Leu Val Pro Ser Val Ser

160

165

170

aca tca tca tta cca aat gga acc gcc agt ctc att cag cct tta ccc 576

Thr Ser Ser Leu Pro Asn Gly Thr Ala Ser Leu Ile Gln Pro Leu Pro

175

180

185

190

att cct tat tct tct tca aca ttg cct cat ggg tca tct tat agt ctg 624

Ile Pro Tyr Ser Ser Thr Leu Pro His Gly Ser Ser Tyr Ser Leu

195

200

205

atg atg gga gga ttt gga ggt gct agt ata cag aaa gcg cag tct ctg 672

Met Met Gly Gly Phe Gly Gly Ala Ser Ile Gln Lys Ala Gln Ser Leu

210

215

220

att gat tta gga tct agt agc tca act tcc tcg act gct tca ctc tca 720

Ile Asp Leu Gly Ser Ser Ser Thr Ser Ser Thr Ala Ser Leu Ser

225

230

235

ggg aac tca ccc aag act ggg acc tca gag tgg gca gtt cct cag cct 768

Gly Asn Ser Pro Lys Thr Gly Thr Ser Glu Trp Ala Val Pro Gln Pro

240

245

250

aca aga tta aaa tat cgg caa aaa ttt aat act ctt gac aaa agt atg 816

Thr Arg Leu Lys Tyr Arg Gln Lys Phe Asn Thr Leu Asp Lys Ser Met

255

260

265

270

agt gga tat ctc tca ggt ttt caa gct aga aat gcc ctt ctt cag tca 864
Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Gln Ala Arg Asn Ala Leu Leu Gln Ser

275

280

285

aat ctt tct caa act cag ctg gct act att tgg act ctg gct gac gtt 912
Asn Leu Ser Gln Thr Gln Leu Ala Thr Ile Trp Thr Leu Ala Asp Val

290

295

300

gat ggt gat gga cag cta aaa gca gaa gag ttt att ctt gca atg cac 960
Asp Gly Asp Gly Gln Leu Lys Ala Glu Glu Phe Ile Leu Ala Met His
305 310 315

ctt act gac atg gcc aaa gct gga cag cca tta cca ctg act tta cct 1008
Leu Thr Asp Met Ala Lys Ala Gly Gln Pro Leu Pro Leu Thr Leu Pro
320 325 330

cct gag ctt gtt cct cca tct ttc aga gga gga aag caa att gat tcc 1056
Pro Glu Leu Val Pro Pro Ser Phe Arg Gly Gly Lys Gln Ile Asp Ser
335 340 345 350

att aat gga act ctg cct tca tat cag aaa atg caa gaa gag gag cct 1104
Ile Asn Gly Thr Leu Pro Ser Tyr Gln Lys Met Gln Glu Glu Glu Pro
355 360 365

cag aag aaa tta cca gtt act ttt gag gac aaa cgg aaa gcc aac tat 1152

Gln Lys Lys Leu Pro Val Thr Phe Glu Asp Lys Arg Lys Ala Asn Tyr

370

375

380

gag cga ggg aac atg gag ctg gaa aag cga cgc caa gcc ttg atg gag 1200

Glu Arg Gly Asn Met Glu Leu Glu Lys Arg Arg Gln Ala Leu Met Glu

385

390

395

cag caa caa agg gag gca gaa cgt aaa gcc cag aaa gaa aag gaa gag 1248

Gln Gln Gln Arg Glu Ala Glu Arg Lys Ala Gln Lys Glu Lys Glu Glu

400

405

410

tgg gaa cga aaa cag aga gaa tta caa gaa caa gaa tgg aag aaa caa 1296

Trp Glu Arg Lys Gln Arg Glu Leu Gln Glu Gln Glu Trp Lys Lys Gln

415

420

425

430

ctt gaa tta gaa aaa cgc tta gag aag caa cgg gaa ttg gag aga caa 1344

Leu Glu Leu Glu Lys Arg Leu Glu Lys Gln Arg Glu Leu Glu Arg Gln

435

440

445

cga gag gaa gaa agg aga aaa gac ata gaa aga cga gag gca gca aaa 1392

Arg Glu Glu Glu Arg Arg Lys Asp Ile Glu Arg Arg Glu Ala Ala Lys

450

455

460

cag gaa ctt gaa cga caa cgt cgc tta gaa tgg gag aga att cgg cga 1440

Gln Glu Leu Glu Arg Gln Arg Arg Leu Glu Trp Glu Arg Ile Arg Arg

465

470

475

cag gag ctt ctc aat caa aag aat aga gaa caa gaa gaa att gtc agg 1488
Gln Glu Leu Leu Asn Gln Lys Asn Arg Glu Gln Glu Glu Ile Val Arg

480

485

490

tta aac tct aaa aag aag aat ctt cat ctt gag ttg gaa gca ctg aat 1536
Leu Asn Ser Lys Lys Asn Leu His Leu Glu Leu Glu Ala Leu Asn
495 500 505 510

ggc aaa cat cag cag atc tca ggc aga ctt cag gat gtc cga ctc aaa 1584
Gly Lys His Gln Gln Ile Ser Gly Arg Leu Gln Asp Val Arg Leu Lys
515 520 525

aag caa act caa aag act gag ctg gaa gtt ctg gat aag cag tgt gac 1632
Lys Gln Thr Gln Lys Thr Glu Leu Glu Val Leu Asp Lys Gln Cys Asp
530 535 540

ttg gaa att atg gaa atc aag caa ctt caa cag gaa ctt cag gaa tat 1680
Leu Glu Ile Met Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Glu Leu Gln Glu Tyr
545 550 555

cag aat aag ctt atc tat ctg gta cct gag aag caa tta tta aat gaa 1728
Gln Asn Lys Leu Ile Tyr Leu Val Pro Glu Lys Gln Leu Leu Asn Glu
560 565 570

aga att aaa aac aac atg cag ttc agt aac aca cct gat tca ggg gtc agt 1776
Arg Ile Lys Asn Met Gln Phe Ser Asn Thr Pro Asp Ser Gly Val Ser
575 580 585 590

tta ctt cat aaa aaa tca tta gaa aag gaa gaa tta tgc caa aga ctt 1824
Leu Leu His Lys Lys Ser Leu Glu Lys Glu Glu Leu Cys Gln Arg Leu
595 600 605

aaa gaa cag tta gat gct ctt gaa aaa gaa act gca tct aag ctg tca 1872
Lys Glu Gln Leu Asp Ala Leu Glu Lys Glu Thr Ala Ser Lys Leu Ser
610 615 620

gaa atg gat tct ttt aac aat caa cta aag gaa ctg aga gaa acc tac 1920
Glu Met Asp Ser Phe Asn Asn Gln Leu Lys Glu Leu Arg Glu Thr Tyr
625 630 635

aac aca cag cag tta gcc ctt gaa cag ctt tat aag atc aaa cgt gac 1968
Asn Thr Gln Gln Leu Ala Leu Glu Gln Leu Tyr Lys Ile Lys Arg Asp
640 645 650

aag ttg aag gaa att gaa agg aaa aga tta gaa cta atg cag aaa aag 2016
Lys Leu Lys Glu Ile Glu Arg Lys Arg Leu Glu Leu Met Gln Lys Lys
655 660 665 670

aaa cta gaa gat gag gct gca agg aaa gca aag caa gga aaa gaa aac 2064
Lys Leu Glu Asp Glu Ala Ala Arg Lys Ala Lys Gln Gly Lys Glu Asn

675	680	685	
tta tgg aaa gaa aat ctt aga aag gag gaa gaa gaa aaa caa aag cga			2112
Leu Trp Lys Glu Asn Leu Arg Lys Glu Glu Glu Lys Gln Lys Arg			
690	695	700	
ctc cag gaa gaa aaa aca caa gaa aaa att caa gaa gag gaa cgg aaa			2160
Leu Gln Glu Glu Lys Thr Gln Glu Lys Ile Gln Glu Glu Glu Arg Lys			
705	710	715	
gct gag gag aaa caa cgt aag gat aag gat act ttg aaa gct gag gag			2208
Ala Glu Glu Lys Gln Arg Lys Asp Lys Asp Thr Leu Lys Ala Glu Glu			
720	725	730	
aaa aaa cgt gag aca gct agt gtt ttg gtg aat tat aga gca tta tac			2256
Lys Lys Arg Glu Thr Ala Ser Val Leu Val Asn Tyr Arg Ala Leu Tyr			
735	740	745	750
ccc ttt gaa gca agg aac cat gat gag atg agt ttt aat tct gga gat			2304
Pro Phe Glu Ala Arg Asn His Asp Glu Met Ser Phe Asn Ser Gly Asp			
755	760	765	
ata att cag gtt gat gaa aaa acc gta gga gaa cct ggt tgg ctt tat			2352
Ile Ile Gln Val Asp Glu Lys Thr Val Gly Glu Pro Gly Trp Leu Tyr			
770	775	780	

ggt agt ttt caa gga aat ttt ggc tgg ttt cca tgc aat tat gta gaa 2400

Gly Ser Phe Gln Gly Asn Phe Gly Trp Phe Pro Cys Asn Tyr Val Glu

785

790

795

aaa atg cca tca agt gaa aat gaa aaa gct gta tct cca aag aag gcc 2448

Lys Met Pro Ser Ser Glu Asn Glu Lys Ala Val Ser Pro Lys Lys Ala

800

805

810

tta ctt cct cct aca gtt tct tta tct gct acc tca act tcc tct gaa 2496

Leu Leu Pro Pro Thr Val Ser Leu Ser Ala Thr Ser Thr Ser Glu

815

820

825

830

cca ctt tct tca aat caa cca gca tca gtg act gat tat caa aat gta 2544

Pro Leu Ser Ser Asn Gln Pro Ala Ser Val Thr Asp Tyr Gln Asn Val

835

840

845

tct ttt tca aac cta act gta aat aca tca tgg cag aaa aaa tca gcc 2592

Ser Phe Ser Asn Leu Thr Val Asn Thr Ser Trp Gln Lys Lys Ser Ala

850

855

860

ttc act cga act gtg tcc cct gga tet gta tca cct att cat gga cag 2640

Phe Thr Arg Thr Val Ser Pro Gly Ser Val Ser Pro Ile His Gly Gln

865

870

875

gga caa gtg gta gaa aac tta aaa gca cag gcc ctt tgt tcc tgg act 2688

Gly Gln Val Val Glu Asn Leu Lys Ala Gln Ala Leu Cys Ser Trp Thr

880	885	890													
gca aag aaa gat aac cac ttg aac ttc tca aaa cat gac att att act 2736															
Ala	Lys	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Asn	Phe	Ser	Lys	His	Asp	Ile	Ile	Thr
895	900	905	910												
gtc ttg gag cag caa gaa aat tgg tgg ttt ggg gag gtg cat gga gga 2784															
Val	Leu	Glu	Gln	Gln	Glu	Asn	Trp	Trp	Phe	Gly	Glu	Val	His	Gly	Gly
915	920	925													
aga gga tgg ttt ccc aaa tct tat gtc aag atc att cct ggg agt gaa 2832															
Arg	Gly	Trp	Phe	Pro	Lys	Ser	Tyr	Val	Lys	Ile	Ile	Pro	Gly	Ser	Glu
930	935	940													
gta aaa cgg gaa gaa cca gaa gct ttg tat gca gct gta aat aag aaa 2880															
Val	Lys	Arg	Glu	Glu	Pro	Glu	Ala	Leu	Tyr	Ala	Ala	Val	Asn	Lys	Lys
945	950	955													
cct acc tcg gca gcc tat tca gtt gga gaa tat att gca ctt tat 2928															
Pro	Thr	Ser	Ala	Ala	Tyr	Ser	Val	Gly	Glu	Glu	Tyr	Ile	Ala	Leu	Tyr
960	965	970													
cca tat tca agt gtg gaa cct gga gat ttg act ttc aca gua ggt gaa 2976															
Pro	Tyr	Ser	Ser	Val	Glu	Pro	Gly	Asp	Leu	Thr	Phe	Thr	Glu	Gly	Glu
975	980	985	990												

gaa ata ttg gtg acc cag aaa gat gga gag tgg tgg aca gga agt att 3024

Glu Ile Leu Val Thr Gln Lys Asp Gly Glu Trp Trp Thr Gly Ser Ile

995

1000

1005

gga gat aga agt gga att ttt cca tca aac tat gtc aaa cca aag gat 3072

Gly Asp Arg Ser Gly Ile Phe Pro Ser Asn Tyr Val Lys Pro Lys Asp

1010

1015

1020

caa gag agt ttt ggg agt gct agc aag tct gga gca tca aat aaa aaa 3120

Gln Glu Ser Phe Gly Ser Ala Ser Lys Ser Gly Ala Ser Asn Lys Lys

1025

1030

1035

cct gag att gct cag gta act tca gca tat gtt gct tct ggt tct gaa 3168

Pro Glu Ile Ala Gln Val Thr Ser Ala Tyr Val Ala Ser Gly Ser Glu

1040

1045

1050

caa ctt agc ctt gca cca gga cag tta ata tta att cta aag aaa aat 3216

Gln Leu Ser Leu Ala Pro Gly Gln Leu Ile Leu Ile Leu Lys Lys Asn

1055

1060

1065

1070

aca agt ggg tgg tgg caa gga gag tta cag gcc aga gga aaa aag cga 3264

Thr Ser Gly Trp Trp Gln Gly Glu Leu Gln Ala Arg Gly Lys Lys Arg

1075

1080

1085

cag aaa gga tgg ttt cct gcc agt cat gtt aaa ctt ttg ggt cca agt 3312

Gln Lys Gly Trp Phe Pro Ala Ser His Val Lys Leu Leu Gly Pro Ser

1090	1095	1100	
agt gaa aga gcc aca cct gcc ttt cat cct gta tgt cag cag att gct 3360			
Ser Glu Arg Ala Thr Pro Ala Phe His Pro Val Cys Gln Val Ile Ala			
1105	1110	1115	
atg tat gac tat gca gca aat aat gaa gat gag ctc agt ttc tcc aag 3408			
Met Tyr Asp Tyr Ala Ala Asn Asn Glu Asp Glu Leu Ser Phe Ser Lys			
1120	1125	1130	
gga caa ctc att aat gtt atg aac aaa gat gat cct gat tgg tgg caa 3456			
Gly Gln Leu Ile Asn Val Met Asn Lys Asp Asp Pro Asp Trp Trp Gln			
1135	1140	1145	1150
gga gag atc aac ggg gtg act ggt ctc ttt cct tca aac tac gtt aag 3504			
Gly Glu Ile Asn Gly Val Thr Gly Leu Phe Pro Ser Asn Tyr Val Lys			
1155	1160	1165	
atg acg aca gac tca gat cca agt caa cag tgg tgt gct gat ctg caa 3552			
Met Thr Thr Asp Ser Asp Pro Ser Gln Gln Trp Cys Ala Asp Leu Gln			
1170	1175	1180	
acc ctg gac aca atg cag cca att gag agg aaa aga cag ggc tat att 3600			
Thr Leu Asp Thr Met Gln Pro Ile Glu Arg Lys Arg Gln Gly Tyr Ile			
1185	1190	1195	

cat gag ctg att cag acc gaa gag egg tac atg gct gac ctt cag ctc 3648

His Glu Leu Ile Gln Thr Glu Glu Arg Tyr Met Ala Asp Leu Gln Leu

1200

1205

1210

gtc gtc gag gtt ttt cag aaa cgc atg gca gag tca ggc ttt ctc act 3696

Val Val Glu Val Phe Gln Lys Arg Met Ala Glu Ser Gly Phe Leu Thr

1215

1220

1225

1230

gaa ggg gag atg gcc ctg att ttt gtt aac tgg aag gag ctc atc atg 3744

Glu Gly Glu Met Ala Leu Ile Phe Val Asn Trp Lys Glu Leu Ile Met

1235

1240

1245

tcc aac aca aag ctg ctg aag gct ttg cgg gtg cgg aag aag acc ggg 3792

Ser Asn Thr Lys Leu Leu Lys Ala Leu Arg Val Arg Lys Lys Thr Gly

1250

1255

1260

ggc gag aag atg ccg gtg cag atg att ggg gac atc ctg gcc gct gag 3840

Gly Glu Lys Met Pro Val Gln Met Ile Gly Asp Ile Leu Ala Ala Glu

1265

1270

1275

ctg tcc cac atg cag gct tac atc agg ttc tgc age tgc cag ctt aat 3888

Leu Ser His Met Gln Ala Tyr Ile Arg Phe Cys Ser Cys Gln Leu Asn

1280

1285

1290

gga gca gct ctg tta cag cag aag aca gat gaa gac aca gat ttc aaa 3936

Gly Ala Ala Leu Leu Gln Gln Lys Thr Asp Glu Asp Thr Asp Phe Lys

1295	1300	1305	1310
gaa ttt tta aag aag ctg gca tct gac ccg cgg tgt aaa gga atg ccc 3984			
Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ala Ser Asp Pro Arg Cys Lys Gly Met Pro			
1315	1320	1325	
ctc tcc agc ttc ctg ctg aaa ccc atg cag agg atc acc cgc tac cca 4032			
Leu Ser Ser Phe Leu Leu Lys Pro Met Gln Arg Ile Thr Arg Tyr Pro			
1330	1335	1340	
ctg ctc atc aga agt att ctg gag aac acc ccg gag agc cat gca gac 4080			
Leu Leu Ile Arg Ser Ile Leu Glu Asn Thr Pro Glu Ser His Ala Asp			
1345	1350	1355	
cat tcc tcc cta aag ctg gcc ctc gag ccg gca gag gag ctg tgc tct 4128			
His Ser Ser Leu Lys Leu Ala Leu Glu Arg Ala Glu Glu Leu Cys Ser			
1360	1365	1370	
caa gtg aat gag gga gtt cgg gag aag gaa aac tcg gac cga ctg gag 4176			
Gln Val Asn Glu Gly Val Arg Glu Lys Glu Asn Ser Asp Arg Leu Glu			
1375	1380	1385	1390
tgg atc cag gcg cac gtg cag tgt gaa ggc ctc gcg gag caa ctt att 4224			
Trp Ile Gln Ala His Val Gln Cys Glu Gly Leu Ala Glu Gln Leu Ile			
1395	1400	1405	

ttc aac tct ctc acc aac tgc ctg ggg ccc egg aag ctc tta cac agt 4272

Phe Asn Ser Leu Thr Asn Cys Leu Gly Pro Arg Lys Leu Leu His Ser

1410

1415

1420

ggg aaa tta tac aag acc aag agc aac aag gaa ctg cac gga ttc ctc 4320

Gly Lys Leu Tyr Lys Thr Lys Ser Asn Lys Glu Leu His Gly Phe Leu

1425

1430

1435

ttc aat gac ttc ctg ctt ctt acc tac atg gtc aag cag ttt gct gtt 4368

Phe Asn Asp Phe Leu Leu Leu Thr Tyr Met Val Lys Gln Phe Ala Val

1440

1445

1450

tcc tct ggc tct gag aaa ctt ttc agc tcg aag tcc aat gct caa ttc 4416

Ser Ser Gly Ser Glu Lys Leu Phe Ser Ser Lys Ser Asn Ala Gln Phe

1455

1460

1465

1470

aaa atg tat aaa acg ccc att ttc ctg aat gaa gtc ttg gtg aaa ctg 4464

Lys Met Tyr Lys Thr Pro Ile Phe Leu Asn Glu Val Leu Val Lys Leu

1475

1480

1485

ccc aca gac cct tcc agc gat gag cct gtc ttc cac att tcc cac att 4512

Pro Thr Asp Pro Ser Ser Asp Glu Pro Val Phe His Ile Ser His Ile

1490

1495

1500

gat egg gtc tac acc ctc cga aca gac aac att aat gag agg acc gcc 4560

Asp Arg Val Tyr Thr Leu Arg Thr Asp Asn Ile Asn Glu Arg Thr Ala

1505	1510	1515	
tgg gtg cag aag atc aag gcg gcg tct gag cag tac atc gac acc gag 4608			
Trp Val Gln Lys Ile Lys Ala Ala Ser Glu Gln Tyr Ile Asp Thr Glu			
1520	1525	1530	
aag aag cag cgt gag aaa gct tac caa gcc cgc tcc caa aag act tca 4656			
Lys Lys Gln Arg Glu Lys Ala Tyr Gln Ala Arg Ser Gln Lys Thr Ser			
1535	1540	1545	1550
ggc att ggg cgc ctg atg gtg cat gtc att gaa gct aca gaa tta aaa 4704			
Gly Ile Gly Arg Leu Met Val His Val Ile Glu Ala Thr Glu Leu Lys			
1555	1560	1565	
gcc tgc aaa cca aat gga aag agc aac cca tac tgt gaa atc agc atg 4752			
Ala Cys Lys Pro Asn Gly Lys Ser Asn Pro Tyr Cys Glu Ile Ser Met			
1570	1575	1580	
ggc tcc cag agc tac acc acc agg acc atc cag gac aca ctc aat ccc 4800			
Gly Ser Gln Ser Tyr Thr Arg Thr Ile Gln Asp Thr Leu Asn Pro			
1585	1590	1595	
aag tgg aat ttt aac tgc cag ttc ttt att aag gat ctc tac caa gac 4848			
Lys Trp Asn Phe Asn Cys Gln Phe Phe Ile Lys Asp Leu Tyr Gln Asp			
1600	1605	1610	

gtg ctg tgt ctc acc ctg ttt gac aga gac cag ttt tca cca gat gat 4896

Val Leu Cys Leu Thr Leu Phe Asp Arg Asp Gln Phe Ser Pro Asp Asp

1615

1620

1625

1630

ttc ctg ggt cgt act gaa att cca gtg gca aaa att cga aca gaa cag 4944

Phe Leu Gly Arg Thr Glu Ile Pro Val Ala Lys Ile Arg Thr Glu Gln

1635

1640

1645

gaa agc aaa ggc cct atg acc cgc cga ctg ctg ctg cat gag gtc ccc 4992

Glu Ser Lys Gly Pro Met Thr Arg Arg Leu Leu Leu His Glu Val Pro

1650

1655

1660

acc ggg gag gtc tgg gtc cgt ttt gac ctg cag ctt ttt gag caa aaa 5040

Thr Gly Glu Val Trp Val Arg Phe Asp Leu Gln Leu Phe Glu Gln Lys

1665

1670

1675

act ctc ctg tag gggttctaaa ggacagcacc agcgggacag cccacaaggc 5092

Thr Leu Leu

1680

tggggctgga gaatgagaga ctgcgtcttc ttggggctga gggagcacca tgcgttttca 5152

cccttcacaa agetcgtgcac gctgggggtt ctgttttctt gcacactaaa tagctageaa 5212

tctatgcaaa caccttccc ataaagaaac caaaacccat agtacagtgc cttgttctag 5272

tgttcacatg ttcagctctg tttgtttaga tgccaagggtt tccattttca gggctataaa 5332

aagtattact tggaaatgag gcatcagacc accagatgtt accgctcggt tgaatgtgtc 5392

caccgtggag tggtttggtg acgctgtaac cattccacgc cagtgacctc tgctgggtca 5452

cagccactca ggaggggaag ggtcaggatg agaggctgca gcctcgacac ttggcgccgc 5512

ctgatactga aatagcgtct actcgtagcac tgaataaaaaa cagaaacttg atcattttat 5572

tctgattag attttatcac tetctgctaa gacaatatac tctggagtagt aagtggaaa 5632

gcttgattta aatactgtga actctaataa tgtggaaaat attttcaac tttaatttc 5692

tgaagtataa attatttatg taaattcatt gttttgcat atttcttagg acatgcac 5752

ttaagcttta tcattgcca tatgtacaga aagagaataa agacatatgt ttatggatga 5812

aaaaaaaaaaaa aaaaaaa 5828

<210> 16

<211> 1681

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Glu Ser Tyr Gln Gly Lys Leu Arg Thr Met Met Ala Gln Phe

1 5 10 15

Pro Thr Ala Met Asn Gly Gly Pro Asn Met Trp Ala Ile Thr Ser Glu

20 25 30

Glu Arg Thr Lys His Asp Arg Gln Phe Asp Asn Leu Lys Pro Ser Gly

35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Gly Asp Gln Ala Arg Asn Phe Phe Leu Gln Ser Gly

50 55 60

Leu Pro Ala Pro Val Leu Ala Glu Ile Trp Ala Leu Ser Asp Leu Asn

65 70 75 80

Lys Asp Gly Lys Met Asp Gln Gln Glu Phe Ser Ile Ala Met Lys Leu

85 90 95

Ile Lys Leu Lys Leu Gln Gly Gln Gln Leu Pro Val Val Leu Pro Pro

100 105 110

Ile Met Lys Gln Pro Pro Met Phe Ser Pro Leu Ile Ser Ala Arg Phe

115 120 125

Gly Met Gly Ser Met Pro Asn Leu Ser Ile Pro Gln Pro Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Ala Pro Ile Thr Ser Leu Ser Ser Ala Thr Ser Gly Thr Asn Leu

145 150 155 160

Pro Pro Leu Met Met Pro Thr Pro Leu Val Pro Ser Val Ser Thr Ser

165 170 175

Ser Leu Pro Asn Gly Thr Ala Ser Leu Ile Gln Pro Leu Pro Ile Pro

180 185 190

Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Pro His Gly Ser Ser Tyr Ser Leu Met Met

195 200 205
Gly Gly Phe Gly Gly Ala Ser Ile Gln Lys Ala Gln Ser Leu Ile Asp
210 215 220
Leu Gly Ser Ser Ser Thr Ser Ser Thr Ala Ser Leu Ser Gly Asn
225 230 235 240
Ser Pro Lys Thr Gly Thr Ser Glu Trp Ala Val Pro Gln Pro Thr Arg
245 250 255
Leu Lys Tyr Arg Gln Lys Phe Asn Thr Leu Asp Lys Ser Met Ser Gly
260 265 270
Tyr Leu Ser Gly Phe Gln Ala Arg Asn Ala Leu Leu Gln Ser Asn Leu
275 280 285
Ser Gln Thr Gln Leu Ala Thr Ile Trp Thr Leu Ala Asp Val Asp Gly
290 295 300
Asp Gly Gln Leu Lys Ala Glu Glu Phe Ile Leu Ala Met His Leu Thr
305 310 315 320
Asp Met Ala Lys Ala Gly Gln Pro Leu Pro Leu Thr Leu Pro Pro Glu
325 330 335
Leu Val Pro Pro Ser Phe Arg Gly Gly Lys Gln Ile Asp Ser Ile Asn
340 345 350
Gly Thr Leu Pro Ser Tyr Gln Lys Met Gln Glu Glu Glu Pro Gln Lys
355 360 365
Lys Leu Pro Val Thr Phe Glu Asp Lys Arg Lys Ala Asn Tyr Glu Arg
370 375 380
Gly Asn Met Glu Leu Glu Lys Arg Arg Gln Ala Leu Met Glu Gln Gln
385 390 395 400
Gln Arg Glu Ala Glu Arg Lys Ala Gln Lys Glu Lys Glu Glu Trp Glu

405 410 415
Arg Lys Gln Arg Glu Leu Gln Glu Gln Glu Trp Lys Lys Gln Leu Glu
420 425 430
Leu Glu Lys Arg Leu Glu Lys Gln Arg Glu Leu Glu Arg Gln Arg Glu
435 440 445
Glu Glu Arg Arg Lys Asp Ile Glu Arg Arg Glu Ala Ala Lys Gln Glu
450 455 460
Leu Glu Arg Gln Arg Arg Leu Glu Trp Glu Arg Ile Arg Arg Gln Glu
465 470 475 480
Leu Leu Asn Gln Lys Asn Arg Glu Gln Glu Glu Ile Val Arg Leu Asn
485 490 495
Ser Lys Lys Asn Leu His Leu Glu Leu Glu Ala Leu Asn Gly Lys
500 505 510
His Gln Gln Ile Ser Gly Arg Leu Gln Asp Val Arg Leu Lys Lys Gln
515 520 525
Thr Gln Lys Thr Glu Leu Glu Val Leu Asp Lys Gln Cys Asp Leu Glu
530 535 540
Ile Met Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Glu Leu Gln Glu Tyr Gln Asn
545 550 555 560
Lys Leu Ile Tyr Leu Val Pro Glu Lys Gln Leu Leu Asn Glu Arg Ile
565 570 575
Lys Asn Met Gln Phe Ser Asn Thr Pro Asp Ser Gly Val Ser Leu Leu
580 585 590
His Lys Lys Ser Leu Glu Lys Glu Glu Leu Cys Gln Arg Leu Lys Glu
595 600 605
Gln Leu Asp Ala Leu Glu Lys Glu Thr Ala Ser Lys Leu Ser Glu Met

610 615 620
Asp Ser Phe Asn Asn Gln Leu Lys Glu Leu Arg Glu Thr Tyr Asn Thr
625 630 635 640
Gln Gln Leu Ala Leu Glu Gln Leu Tyr Lys Ile Lys Arg Asp Lys Leu
645 650 655
Lys Glu Ile Glu Arg Lys Arg Leu Glu Leu Met Gln Lys Lys Lys Leu
660 665 670
Glu Asp Glu Ala Ala Arg Lys Ala Lys Gln Gly Lys Glu Asn Leu Trp
675 680 685
Lys Glu Asn Leu Arg Lys Glu Glu Glu Lys Gln Lys Arg Leu Gln
690 695 700
Glu Glu Lys Thr Gln Glu Lys Ile Gln Glu Glu Glu Arg Lys Ala Glu
705 710 715 720
Glu Lys Gln Arg Lys Asp Lys Asp Thr Leu Lys Ala Glu Glu Lys Lys
725 730 735
Arg Glu Thr Ala Ser Val Leu Val Asn Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro Phe
740 745 750
Glu Ala Arg Asn His Asp Glu Met Ser Phe Asn Ser Gly Asp Ile Ile
755 760 765
Gln Val Asp Glu Lys Thr Val Gly Glu Pro Gly Trp Leu Tyr Gly Ser
770 775 780
Phe Gln Gly Asn Phe Gly Trp Phe Pro Cys Asn Tyr Val Glu Lys Met
785 790 795 800
Pro Ser Ser Glu Asn Glu Lys Ala Val Ser Pro Lys Lys Ala Leu Leu
805 810 815
Pro Pro Thr Val Ser Leu Ser Ala Thr Ser Thr Ser Ser Glu Pro Leu

820 825 830
Ser Ser Asn Gln Pro Ala Ser Val Thr Asp Tyr Gln Asn Val Ser Phe
835 840 845
Ser Asn Leu Thr Val Asn Thr Ser Trp Gln Lys Lys Ser Ala Phe Thr
850 855 860
Arg Thr Val Ser Pro Gly Ser Val Ser Pro Ile His Gly Gln Gly Gln
865 870 875 880
Val Val Glu Asn Leu Lys Ala Gln Ala Leu Cys Ser Trp Thr Ala Lys
885 890 895
Lys Asp Asn His Leu Asn Phe Ser Lys His Asp Ile Ile Thr Val Leu
900 905 910
Glu Gln Gln Glu Asn Trp Trp Phe Gly Glu Val His Gly Gly Arg Gly
915 920 925
Trp Phe Pro Lys Ser Tyr Val Lys Ile Ile Pro Gly Ser Glu Val Lys
930 935 940
Arg Glu Glu Pro Glu Ala Leu Tyr Ala Ala Val Asn Lys Lys Pro Thr
945 950 955 960
Ser Ala Ala Tyr Ser Val Gly Glu Glu Tyr Ile Ala Leu Tyr Pro Tyr
965 970 975
Ser Ser Val Glu Pro Gly Asp Leu Thr Phe Thr Glu Gly Glu Glu Ile
980 985 990
Leu Val Thr Gln Lys Asp Gly Glu Trp Trp Thr Gly Ser Ile Gly Asp
995 1000 1005
Arg Ser Gly Ile Phe Pro Ser Asn Tyr Val Lys Pro Lys Asp Gln Glu
1010 1015 1020
Ser Phe Gly Ser Ala Ser Lys Ser Gly Ala Ser Asn Lys Lys Pro Glu

1025 1030 1035 1040
Ile Ala Gln Val Thr Ser Ala Tyr Val Ala Ser Gly Ser Glu Gln Leu
1045 1050 1055
Ser Leu Ala Pro Gly Gln Leu Ile Leu Ile Leu Lys Lys Asn Thr Ser
1060 1065 1070
Gly Trp Trp Gln Gly Glu Leu Gln Ala Arg Gly Lys Lys Arg Gln Lys
1075 1080 1085
Gly Trp Phe Pro Ala Ser His Val Lys Leu Leu Gly Pro Ser Ser Glu
1090 1095 1100
Arg Ala Thr Pro Ala Phe His Pro Val Cys Gln Val Ile Ala Met Tyr
1105 1110 1115 1120
Asp Tyr Ala Ala Asn Asn Glu Asp Glu Leu Ser Phe Ser Lys Gly Gln
1125 1130 1135
Leu Ile Asn Val Met Asn Lys Asp Asp Pro Asp Trp Trp Gln Gly Glu
1140 1145 1150
Ile Asn Gly Val Thr Gly Leu Phe Pro Ser Asn Tyr Val Lys Met Thr
1155 1160 1165
Thr Asp Ser Asp Pro Ser Gln Gln Trp Cys Ala Asp Leu Gln Thr Leu
1170 1175 1180
Asp Thr Met Gln Pro Ile Glu Arg Lys Arg Gln Gly Tyr Ile His Glu
1185 1190 1195 1200
Leu Ile Gln Thr Glu Glu Arg Tyr Met Ala Asp Leu Gln Leu Val Val
1205 1210 1215
Glu Val Phe Gln Lys Arg Met Ala Glu Ser Gly Phe Leu Thr Glu Gly
1220 1225 1230
Glu Met Ala Leu Ile Phe Val Asn Trp Lys Glu Leu Ile Met Ser Asn

1235 1240 1245
Thr Lys Leu Leu Lys Ala Leu Arg Val Arg Lys Lys Thr Gly Gly Glu
1250 1255 1260
Lys Met Pro Val Gln Met Ile Gly Asp Ile Leu Ala Ala Glu Leu Ser
1265 1270 1275 1280
His Met Gln Ala Tyr Ile Arg Phe Cys Ser Cys Gln Leu Asn Gly Ala
1285 1290 1295
Ala Leu Leu Gln Gln Lys Thr Asp Glu Asp Thr Asp Phe Lys Glu Phe
1300 1305 1310
Leu Lys Lys Leu Ala Ser Asp Pro Arg Cys Lys Gly Met Pro Leu Ser
1315 1320 1325
Ser Phe Leu Leu Lys Pro Met Gln Arg Ile Thr Arg Tyr Pro Leu Leu
1330 1335 1340
Ile Arg Ser Ile Leu Glu Asn Thr Pro Glu Ser His Ala Asp His Ser
1345 1350 1355 1360
Ser Leu Lys Leu Ala Leu Glu Arg Ala Glu Glu Leu Cys Ser Gln Val
1365 1370 1375
Asn Glu Gly Val Arg Glu Lys Glu Asn Ser Asp Arg Leu Glu Trp Ile
1380 1385 1390
Gln Ala His Val Gln Cys Glu Gly Leu Ala Glu Gln Leu Ile Phe Asn
1395 1400 1405
Ser Leu Thr Asn Cys Leu Gly Pro Arg Lys Leu Leu His Ser Gly Lys
1410 1415 1420
Leu Tyr Lys Thr Lys Ser Asn Lys Glu Leu His Gly Phe Leu Phe Asn
1425 1430 1435 1440
Asp Phe Leu Leu Leu Thr Tyr Met Val Lys Gln Phe Ala Val Ser Ser

1445 1450 1455
Gly Ser Glu Lys Leu Phe Ser Ser Lys Ser Asn Ala Gln Phe Lys Met
1460 1465 1470
Tyr Lys Thr Pro Ile Phe Leu Asn Glu Val Leu Val Lys Leu Pro Thr
1475 1480 1485
Asp Pro Ser Ser Asp Glu Pro Val Phe His Ile Ser His Ile Asp Arg
1490 1495 1500
Val Tyr Thr Leu Arg Thr Asp Asn Ile Asn Glu Arg Thr Ala Trp Val
1505 1510 1515 1520
Gln Lys Ile Lys Ala Ala Ser Glu Gln Tyr Ile Asp Thr Glu Lys Lys
1525 1530 1535
Gln Arg Glu Lys Ala Tyr Gln Ala Arg Ser Gln Lys Thr Ser Gly Ile
1540 1545 1550
Gly Arg Leu Met Val His Val Ile Glu Ala Thr Glu Leu Lys Ala Cys
1555 1560 1565
Lys Pro Asn Gly Lys Ser Asn Pro Tyr Cys Glu Ile Ser Met Gly Ser
1570 1575 1580
Gln Ser Tyr Thr Thr Arg Thr Ile Gln Asp Thr Leu Asn Pro Lys Trp
1585 1590 1595 1600
Asn Phe Asn Cys Gln Phe Phe Ile Lys Asp Leu Tyr Gln Asp Val Leu
1605 1610 1615
Cys Leu Thr Leu Phe Asp Arg Asp Gln Phe Ser Pro Asp Asp Phe Leu
1620 1625 1630
Gly Arg Thr Glu Ile Pro Val Ala Lys Ile Arg Thr Glu Gln Glu Ser
1635 1640 1645
Lys Gly Pro Met Thr Arg Arg Leu Leu Leu His Glu Val Pro Thr Gly

1650 1655 1660
Glu Val Trp Val Arg Phe Asp Leu Gln Leu Phe Glu Gln Lys Thr Leu
1665 1670 1675 1680
Leu

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08937

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q 1/68, C12N 15/09, G01N 33/53, G01N 33/50, C12Q 1/02, A61K 48/00, A61K 39/395, A01K 67/027 // C07K 16/18, C12N 5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q 1/68, C12N 15/09, G01N 33/53, G01N 33/50, C12Q 1/02, A61K 48/00, A61K 39/395, A01K 67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/27861 A1 (The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University), 18 May, 2000 (18.05.00) (Family: none)	1-12, 14-18
A	PUCHARCOS, C. et al., "Intersection 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis", FEBS Letters, July, 2000, Vol.478, No.1-2, pages 43 to 51	1-12, 14-18
A	WO 99/55728 A2 (HSC Research and Development Limited Partnership), 04 November, 1999 (04.11.99), & AU 9936950 A	1-12, 14-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 November, 2001 (19.11.01)

Date of mailing of the international search report
27 November, 2001 (27.11.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08937

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 13
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The remedies for allergic diseases as set forth in claim 13 are remedies containing as the active ingredient any compounds obtained by any of the screening methods as set forth in claims 8 and 10 to 12. However, no particular example of these compounds is given in the description. Namely, these remedies are not fully supported by the description.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12Q 1/68, C12N 15/09, G01N 33/53, G01N 33/50, C12Q 1/02, A61K 48/00, A61K 39/395, A01K 67/027
// C07K 16/18, C12N 5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12Q 1/68, C12N 15/09, G01N 33/53, G01N 33/50, C12Q 1/02, A61K 48/00, A61K 39/395, A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, REGISTRY(STN), CA(STN), MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/27861 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 18.5月.2000(18.05.00) (ファミリーなし)	1-12, 14-18
A	PUCHARCOS, C. et al. Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. FEBS Lett. Jul. 2000, Vol. 478, No. 1-2, p. 43-51	1-12, 14-18
A	WO 99/55728 A2 (HSC RSEARCH AND DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP) 4.11月.1999(04.11.99) & AU 9936950 A	1-12, 14-18

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 19.11.01	国際調査報告の発送日 27.11.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 印	4 B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求の範囲 13 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

請求の範囲 13 に記載のアレルギー性疾患の治療薬は、請求の範囲 8、10—12 のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られるあらゆる化合物を包含する化合物を有効成分として含有する治療薬であるが、明細書には、上記化合物として具体的なものが記載されておらず、明細書による十分な裏付けを欠いている。

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。